

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

0.24

Введение в **БИО
МЕМБРАНО
ЛОГИЮ**



Введение в **БИО- МЕМБРАНО- ЛОГИЮ**

Под редакцией
А.А.БОЛДЫРЕВА

Допущено Государственным комитетом СССР по народному образованию в качестве учебного пособия для студентов биологических специальностей университетов.

Издательство
Московского университета
1990

ББК 28.072
В 24
УДК 571.1

Авторы:

А. А. Болдырев, С. В. Котелевцев, М. Ланио, К. Альварес и П. Перес

Рецензенты:

кафедра биотехнологии МИТХТ (зав. кафедрой проф. В. И. Швец),
член-корреспондент АН СССР А. И. Арчаков

В 24 Введение в биомембранологию: Учеб. пособие/Под ред.
А. А. Болдырева. — М.: Изд-во МГУ. 1990. — 208 с.: ил.
ISBN 5—211—01118—X.

Учебное пособие систематизирует современные сведения о строении и принципах функционирования биологических мембран и мембранных ферментных систем, включает изложение методологии исследования биомембран, существенной для биотехнологии и медицинской биохимии. В пособии не только рассмотрены теоретические основы мембранологии, но и приведены конкретные примеры использования результатов исследования биомембран для получения биологически активных соединений, медицинской диагностики, охраны окружающей среды.

Для студентов, изучающих биохимию и физикохимию биологических мембран, а также для специалистов в области биотехнологии, биохимии, физико-химической биологии.

В 1903010000(4309000000)—077 145—90
077(02)—90

ББК 28.072

ISBN 5—211—01118—X

© Коллектив авторов, 1990

ПРЕДИСЛОВИЕ

По мере развития биологии определяющая роль мембран в жизни клетки становится все более очевидной. Эта структура в силу особенностей своего строения является не только обязательной для любой растительной, животной или бактериальной клетки, но и определяет особенности их функционирования.

К давно известным свойствам мембран отграничивать клетки от окружающей среды или создавать отдельные компартменты внутри клетки, контролировать проникновение в клетку и из нее огромного разнообразия соединений, обеспечивать специфику межклеточных контактов и иммунологических проявлений, в результате бурного развития науки прибавились и принципиально новые качества:

- 1) способность воспринимать, усиливать и передавать внутрь клетки сигналы из внешней среды;
- 2) обеспечивать образование и транспорт вдоль по мембранным индукторам специфической разности потенциалов, играющих роль специфического источника энергии;
- 3) создавать специальные условия для протекания реакций, осуществляемых гидрофобными мембранными белками;
- 4) осуществлять контроль за взаимодействием между отдельными белками, погруженными в мембранную толщу.

Распространение и углубление наших знаний о биологических мембранах привело к образованию новой отрасли знаний — биомембранологии, к формированию курсов мембранной биохимии для студентов, изучающих биологию клетки.

В настоящее время для студентов, специализирующихся в этом направлении, имеется большое количество научных обзоров, монографий и учебников, различающихся как терминологией и характером изложения материала, так и оценкой важности той или иной области биомембранологии. В отечественной литературе имеется определенный опыт создания учебного пособия по биомембранологии (см. П. Г. Богач и др. Структура и функции биологических мембран. Киев, М., 1981; А. А. Болдырев. Биологические мембраны и транспорт ионов, М., 1985. Е. М. Крепс. Липиды клеточных мембран. Л., 1981).

Учтя положительный опыт этих изданий, авторы предприняли попытку написать учебник, который бы мог сыграть роль базового для обучения студентов-биологов стран-членов СЭВ и СФРЮ. Несмотря на такое желание, весьма вероятно, что учебник не по-

лучился всеобъемлющим как из-за ограниченности его объема, так и в силу специфики собственно научных интересов авторского коллектива, состоящего из специалистов-биохимиков, работающих на биологических факультетах Московского государственного университета и Гаванского университета.

Книга рассчитана на студентов и аспирантов, специализирующихся по биохимии, биофизике, молекулярной биологии и физиологии, а также исследователей, работающих в смежных областях.

Глава I. СТРУКТУРА БИОМЕМБРАН

Клеточное строение тканей позволяет отграничивать живое от неживого, контролировать взаимодействие клеток со средой и друг с другом, обеспечивать разделение внутреннего объема клетки на отдельные отсеки — *компарменты*. Все эти функции выполняются *биологическими мембранами*. Перечень основных структур клетки и их функций представлен в табл. 1.

Таблица 1

Структурные компоненты клетки и их основные функции

Компоненты клеточной структуры	Биологическая роль
Плазматическая мембрана	обеспечивает диффузионный барьер, активный транспорт ионов и метаболитов, электрическую возбудимость, межклеточную коммуникацию и пр.
Эндоплазматический ретикулум гладкий	обеспечивает детоксикацию ядовитых веществ, синтез фосфолипидов и стероидов
шероховатый	покрыт рибосомами, осуществляющими поставку белка, который транспортируется эндоплазматической сетью в различные отделы клетки
Аппарат Гольджи	осуществляет секрецию и хранение «упакованных» белков и биологически активных веществ
Лизосомы	содержит более 50 ферментов, обеспечивающих реакции распада белков, углеводов, жиров и нуклеиновых [кислот; участвуют в фагоцитозе и эндоцитозе
Фагосомы	образуются путем замыкания плазматической мембраны; включают частицы, захваченные из окружающей среды,
Митохондрии	представляют собой мембранные органеллы, осуществляющие превращения жирных кислот и их фрагментов, продуктов обмена углеводов и аминокислот; специализированы на образовании АТФ
Пероксисомы	содержат ферменты окисления
Ядерная оболочка	окружает ядерный материал, состоит из внешней и внутренней мембран, имеет поры, через которые РНК может проникать из ядра в цитоплазму
Микрофиламенты (микротрубочки и микрофибриллы)	составляют основу цитоскелета, [прилегающего к мембране с цитоплазматической стороны; создают опорную конструкцию клетки, препятствуют резким изменениям ее объема; противодействуют образованию небислойных структур в фосфолипидном матриксе

Микросомы	представляют собой фрагменты мембран различного происхождения, образующиеся в процессе гомогенизации клеточного материала и выделения мембранных структур
Липосомы и протеолипосомы	искусственные мембранные структуры, состоящие из липидов или липидов с включением белков (протеолипосомы); применяются для исследования мембранных структур, их реконструкции; в медицине — для транспортировки лекарств внутри организма

Эффективное выполнение биологическими мембранами разнообразных функций возможно благодаря уникальным свойствам образующих мембраны компонентов.

Основные компоненты биологических мембран — липиды (30%), белки (60%) и углеводы (10%). Нуклеиновые кислоты, полиамины, неорганические ионы — минорные компоненты. Имеются также слабосвязанные компоненты, которые переходят в цитоплазму при изоляции мембран. В мембранах обнаруживается относительно большое количество (около 30% всего веса) невымораживаемой (связанной) воды.

Как же организованы и какие функции выполняют эти структуры?

1.1. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БИОМЕМБРАН

1.1.1. Классификация и характеристика мембранных липидов

В составе биологических мембран обнаруживаются липиды трех основных классов: *фосфолипиды*, *гликолипиды* и *стероиды* (рис. 1). *Фосфолипиды* подразделяются на *глицерофосфолипиды* (производные фосфатидной кислоты — фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит) и *сфингофосфолипиды* (производные церамида, сфингомиелины).

Из рис. 1 видно, что наиболее часто встречающиеся фосфолипиды построены по единому плану, их молекулы стерически хорошо «соответствуют» друг другу. В то же время единообразие структур не исключает наличия огромного числа фосфолипидов, обеспечиваемого разнообразием жирных кислот, которые входят в состав их молекул. Так, существует несколько десятков природных видов одного лишь фосфатидилхолина, причем они существенно отличаются друг от друга по своим физическим и химическим свойствам.

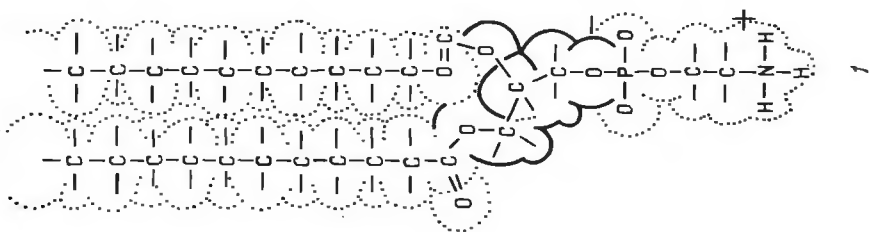
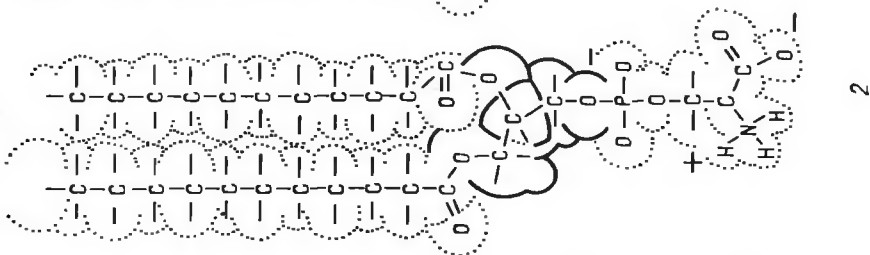
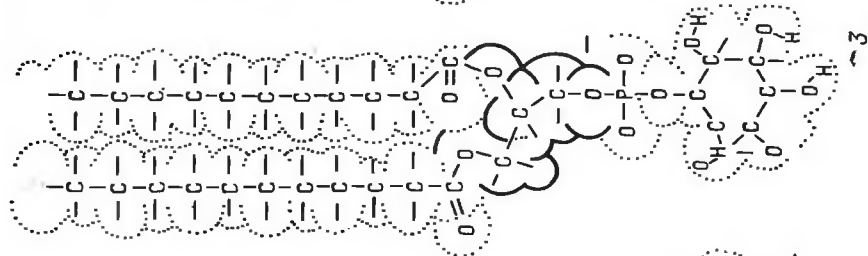
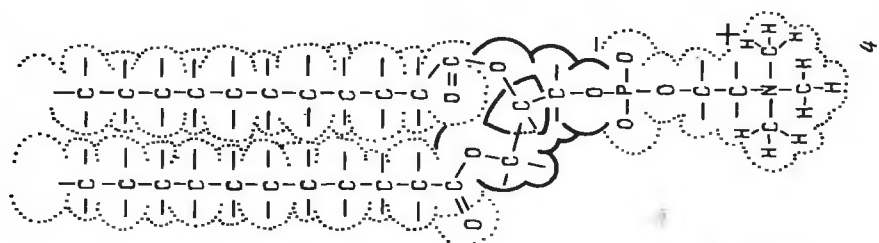
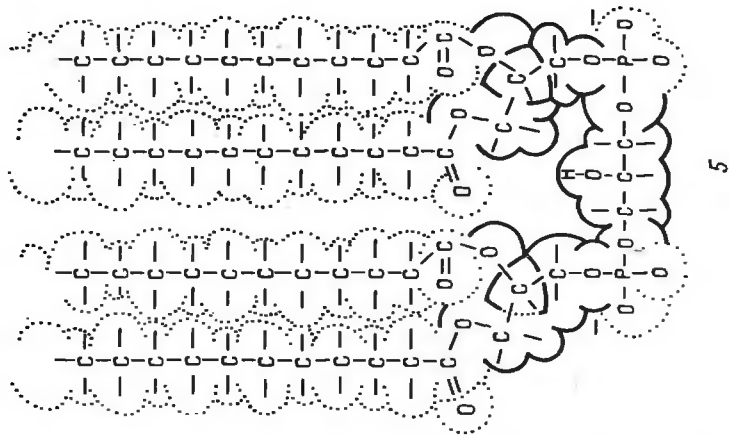


Рис. 1

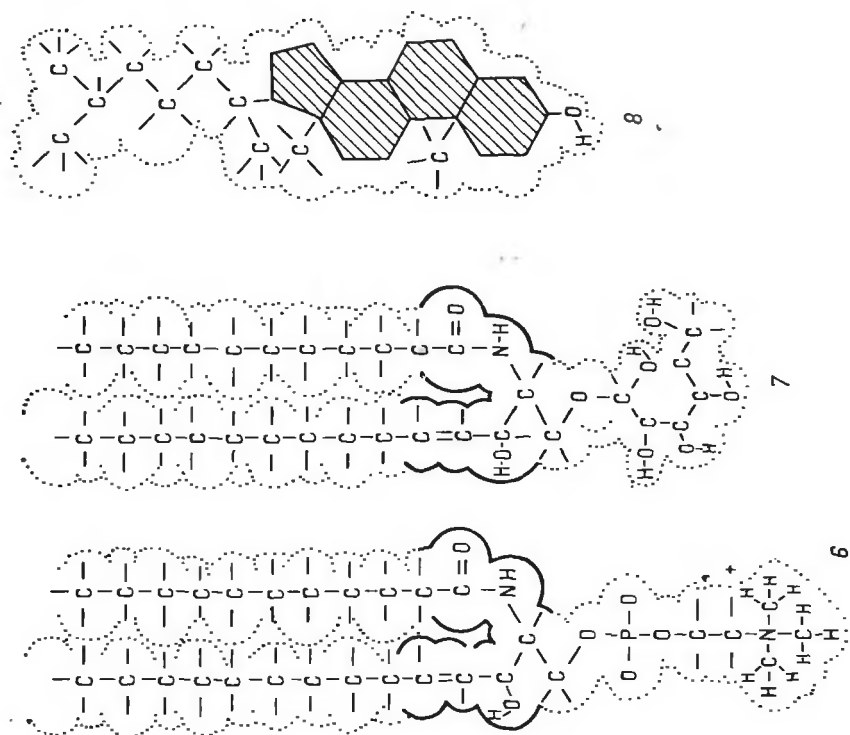
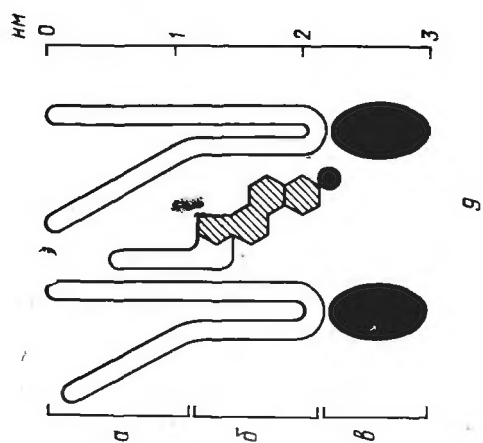


Рис. 1



Гликолипиды мембран представлены *цереброзидами, сульфатидами и ганглиозидами*. Все они содержат углеводные компоненты. *Цереброзиды* — углеводные производные церамида (их называют также гликозилцерамидами, или гликосфинголипидами). Их углеводная часть представлена моно- или олигосахарами. В эритроцитах человека большая часть гликолипидов представлена глюкозилцерамидом, галактозилглюкозилцерамидом, ди-галактозилглюкозилцерамидом и его N-ацетилгалактозаминовым производным. Гликолипиды, в которых углеводная часть включает разветвленные цепи, встречаются относительно редко.

Цереброзиды — нейтральные соединения. Их сульфозефир, образованный при участии ОН-группы углеводного компонента, называемые *сульфocereброзидами*, или *сульфатидами*, имеют ярко выраженный кислый характер.

Гликолипиды, концевые остатки углеводного скелета которых представлены N-ацетилнейраминовой кислотой, называют *ганглиозидами*.

Стероиды мембран, построенные на основе стеранового скелета, представлены в основном холестерином (у животных), ситостерином и стигмастерином (широко распространены у высших растений), эргостерином (у грибов) и тетрахименином (найден у тетрахимены).

Кроме указанных липидов существуют и менее широко распространенные соединения своеобразной структуры. У ряда бактерий и грибов найдены орнитолипиды — производные 3-окси-жирной кислоты и орнитина (иногда — лизина). В некоторых органеллах растительных и животных клеток (как, например, в митохондриях) особенно велико содержание дифосфатидиллипидов; основной представитель этой группы липидов — *кардиолипин* — неперенный компонент митохондриальных мембран.

В 1964 г. было обнаружено, что диатомовые водоросли содержат сульфоллипиды, аналогичные по строению фосфолипидам, но с заменой атома N на атом S. По-видимому, эти водоросли способны производить сульфохоллин из цистеина и метионина, что, по предположению М. Кейтса, открывшего эту особенность диатомовых водорослей, исключает их из устоявшихся пищевых цепей в морской среде.

В созревающих семенах и клетках регенерирующих тканей обнаруживаются диольные фосфолипиды, молекулы которых вместо глицерина содержат этиленгликоль или пропандиол. Количество диольных фосфолипидов резко возрастает при увеличении функциональной активности клеток.

Рис. 1. Химические формулы распространенных липидов биологических мембран: 1 — фосфатидилэтанолламин, 2 — фосфатидилсерин, 3 — фосфатидилинозит, 4 — фосфатидилхоллин (лецитин), 5 — кардиолипин, 6 — сфингомиелин, 7 — цереброзид, 8 — холестерин, 9 — упаковка молекулы холестерина между двумя молекулами фосфолипидов; а — наименее упорядоченная область билayers, б — область, упорядочиваемая холестерином, в — область полярных голов

В состав мембран многих бактерий входят специфические алкоксипипиды (рис. 2): алкил- и алкенилглицериды. Особенности их структуры определяют более плотную упаковку поверхностного слоя мембраны. Бактериальные мембраны содержат также плазмалогены и их глицероацетали. У бактерий класса *Clostridia*, образующих масляную кислоту, обнаружены *димерные плазмалогены*, соединенные друг с другом посредством длинноцепочечных дикарбоновых жирных кислот, содержащих боковые метильные группы.

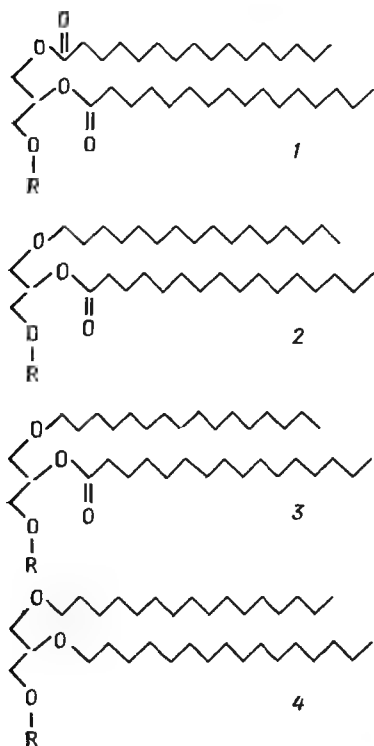


Рис. 2

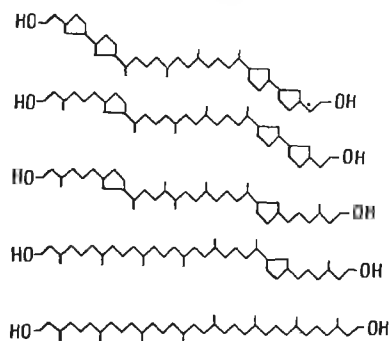


Рис. 3

Рис. 2. Схематическое изображение диацилглицеридов (1) и алкоксиглицеридов (2-4): 1 — 1,2-диацилглицерид, 2 — 1-алкенил,2-ацилглицерид, 3 — 1-О-алкил,2-ацилглицерид, 4 — 1,2-ди-О-алкилглицерид

Рис. 3. Структура бифитанильных цепей, содержащих пентациклические кольца, характерные для липидов термоацидофильных археобактерий

Солелюбивые бактерии *Halobacterium* содержат в составе липидов вместо жирных кислот так называемые фитанильные C_{20} — соединения, включающие ответвления метильных групп. Они напоминают по структуре фитолные группы хлорофилла после насыщения всех их двойных связей.

Термоацидофильные и метанообразующие бактерии, живущие в сточных водах, содержат в составе мембран сомкнутые метильными концами дифитанильные глицерозфир — бифитанильные диглицеротетраэфиры. Это создает повышенную

прочность бислоя, способного сопротивляться действию высокой температуры и образуемого бактериями метана.

Дифитанильные фосфолипиды обладают такой же стереоконфигурацией, как и фосфо-(глико-)липиды, аналогичным расположением зарядов в полярных головках, и образуют липосомы в смеси с гликолипидами. Дифитанильные фосфолипиды, имеющие полярные головы разной природы, входя в бислой, обеспечивают его асимметричное строение, поскольку различный набор полярных голов по обе стороны гидрофобной сердцевины мембраны определяется структурой входящих в ее состав соединений. При этом, как правило, с внутренней, цитоплазматической стороны бислоя оказываются глицерофосфаты, а с внешней — молекулы глицерина, к которым прикрепляются различные углеводные радикалы.

Таблица 2

Мембранные липиды некоторых прокариот

Группа бактерий	Характерные липиды	Тип структуры на рис. 4
Анаэробные зубактерии	плазмалогены (плазменилэтаноламин, плазменилсерин)	I
молочнокислые бактерии	плазмалогены (плазменилэтаноламин, плазменилглицерин, плазмалогенная форма кардиолипина, плазменил-N-монометилэтаноламин)	I
<i>Veillonella parvula</i>		
маслянокислые бактерии		
<i>Clostridia butyricum</i>		
<i>Clostridia acetobutyricum</i>	глицероацетали плазменилэтанолamina	II
<i>Butyriovibrio</i> sp.	плазмалогены и их производные с диаболческими кислотами	I, III
<i>Thermodesulfotobacterium commune</i>	диалкилглицероэфир	V
Архебактерии		
все виды	глицерофитанильные диэфир	VI
термофилы и метаногены	глицерофитанильные диэфир и диглицеробифитанильные тетраэфир	X
соле- и щелочелюбивые метаногены	$C_{20} + C_{25}$ диэфир	VIII
	C_{40} бифитанильные диэфир с макроциклическими петлями	VII
сульфобактерии	глицеротетраэфир, $C_{40} + C_{20}$ тетраэфир	XI, X

Бифитанильные цепи термоацидофильных бактерий часто включают пентациклические кольца (рис. 3), присутствие которых сильно модифицирует структуру мембраны. Основные типы структурных элементов, составляющих бактериальную мембрану, изображены на рис. 4. В табл. 2 систематизированы данные о распределении ряда нетипичных липидов у прокариот. По-видимому, особенности мембранного состава позволяют сочетать в структуре бактериальной мембраны рыхлость упаковки с определенной устойчивостью к неблагоприятным факторам среды.

Интересным, хотя и неясным по своему значению, фактом является то, что липиды галофильных бактерий по структуре пред-

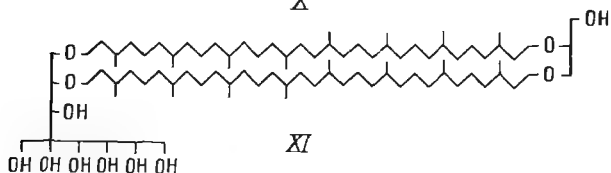
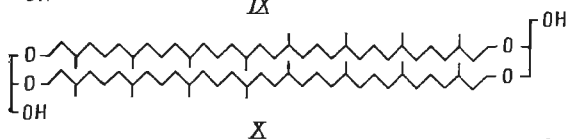
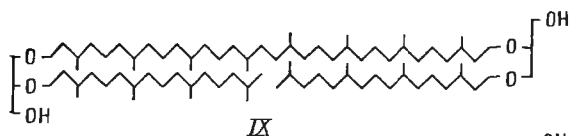
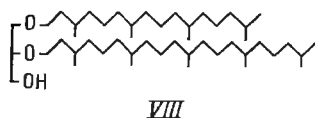
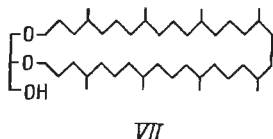
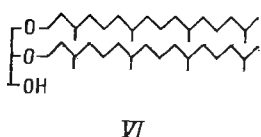
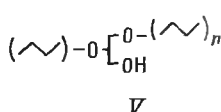
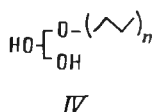
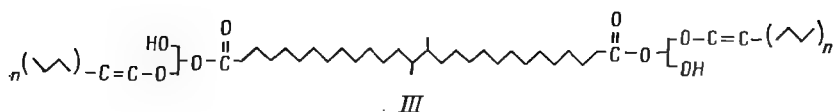
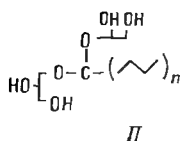


Рис. 4. Основные типы бактериальных эфироллипидов: n — варьирующее количество атомов углерода в боковых алкильных цепях; в случаях I, II и IV боковые цепи у второго углерода глицеринового остова не показаны

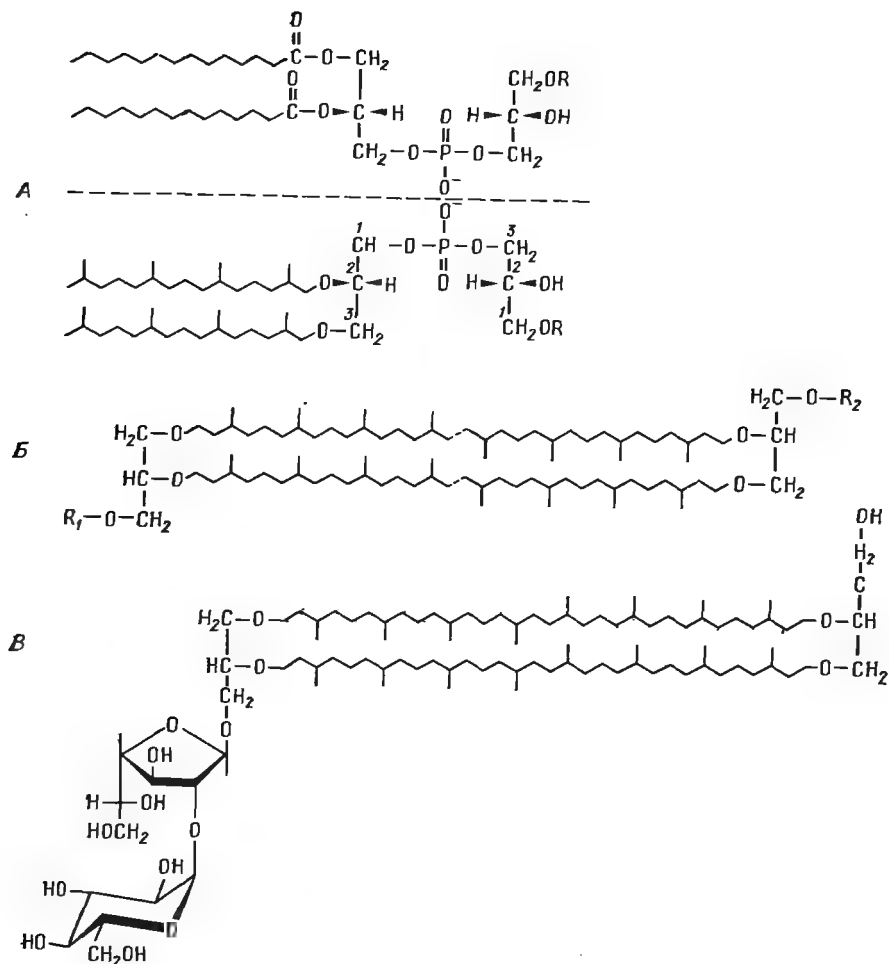


Рис. 5. Структура некоторых нестандартных липидов: *A* — сравнение строения диацил- и диферулилфосфатидилглицеринов; *Б* — тетраэфир, образованный из двух производных диферулилглицерина; *В* — биферулил-тетраэфир метано-
генных бактерий

ставляют собой зеркальное отражение мембранных липидов животной клетки (рис. 5).

Особенности липидного состава бактерий часто используют для их классификации. Деление бактерий на *грамотрицательные* и *грамположительные* основано на отсутствии или наличии окраски по Граму генцианфиолетовым (реактив, содержащий сафранин с кристаллическим йодом) в соответствии с наличием или отсутствием в составе клеточной стенки пептидогликанов и тейхоевых кислот. Особенности строения бактериальной оболочки объяс-

няется тот факт, что на грамположительные бактерии действует пенициллин, а на граммотрицательные — стрептомицин. Грамположительные бактерии (например, *B. megaterium*) содержат в основном кардиолипин, фосфатидилглицерин и фосфатидилхолин; жирные кислоты в составе липидов этих бактерий представлены соединениями с нечетным количеством атомов углерода и с разветвленными цепями. Грамотрицательные бактерии (*E. coli*) содержат не фосфатидилхолин, а фосфатидилэтаноламин, имеют жирные кислоты с четным числом атомов углерода, а в составе гликолипидов обнаруживают жирные оксикислоты. Обе группы бактерий относятся к эубактериям.

Галофильные (солелюбивые), термофильные и метаногенные бактерии так сильно отличаются от эубактерий по целому ряду признаков, что в настоящее время их выделяют в отдельную группу архебактерий. Полагают, что они являются представителями наиболее древней ветви живых существ. Все они содержат мало холестерина и много глико- и сульфолипидов.

И фосфо- и гликолипиды включают в состав молекулы жирнокислотные (ацильные) цепи. Холестерин и его аналоги также способны образовывать эфиры с разнообразными жирными кислотами, используя для этого C_3 -гидроксильную (β -ОН)-группу цикlopentanпергидрофенатренового кольца. Ввиду большого разнообразия жирных кислот, входящих в состав мембранных липидов (табл. 3), образующиеся при этом соединения исключительно разнообразны.

В публикациях, посвященных исследованию свободных жирных кислот и их производных, используются различные названия химических и биологических соединений этих веществ и их свободных форм. Это приводит к разночтениям и неоднозначной трактовке результатов. Наиболее уязвим термин «свободные жирные кислоты (СЖК)». «Свободные» означает «не эстерифицированные». Но часто его употребляют в смысле «не связанные с белком». Эстерифицированные ЖК, однако, уже не являются собственно ЖК — это эфиры, а не жирные кислоты. Но для этой группы соединений иногда необоснованно применяется термин «связанные жирные кислоты», это создает путаницу, так как физико-химический анализ указывает на возможность ковалентного связывания жирных кислот с белковыми или фосфолипидными молекулами. Особенно активно связывает жирные кислоты с помощью гидрофобных взаимодействий альбумин.

Другая сложность номенклатуры жирных кислот в физиологических условиях заключается в том, что они присутствуют при нейтральных рН как в нейтральной, так и частично в ионизированной форме или в виде солей с различными катионами. Так, термин «пальмитат» при рН 7,4 характеризует смесь свободной и ионизированной форм этой кислоты, а также ее соли. Тот же суффикс «ат» характерен для ее эфира, например с холестерином (холестерил-пальмитат), где ЖК, однако, имеет уже совершенно иное качество. Да и для процесса транспорта через биомембраны ионные

Распространенные жирные кислоты в составе мембранных липидов

Соединение	Тривиальное название	Молекулярная масса, Да**	Температура плавления, °С
C _{12:0} *	лауриловая	200,3	44,2
C _{14:0}	миристиновая	228,4	53,9
C _{16:0}	пальмитиновая	256,4	63,1
C _{17:0}	маргариновая	270,4	61,3
C _{18:0}	стеариновая	284,5	69,6
C _{20:0}	арахиновая	312,5	76,5
C _{22:0}	бегеновая	340,6	81,5
C _{24:0}	лигноцериновая	368,5	86,0
C _{16:1(9)}	пальмитоолеиновая	254,4	—0,5
C _{18:1(9c)}	олеиновая	282,5	13,5
C _{18:1(9t)}	элаидиновая	282,5	44,5
C _{18:1(7)}	вакценовая	282,5	44,0
C _{24:1(9)}	нервоновая	366,6	42,5
C _{18:2(9, 12)}	линолевая	280,5	—5,0
C _{18:3(9, 12, 15)}	линоленовая	278,4	—10,0
C _{20:4(5, 8, 11, 14)}	арахидоновая	304,5	—49,5
C _{22:5(7, 10, 13, 16, 19)}	клубанодоновая	330,5	—45,0
C _{22:6(4, 7, 10, 13, 16, 19)}	докозагексаеновая	328,5	—44,1

* В классификации жирных кислот вслед за числом углеродных атомов через двоеточие указывается количество двойных связей, в скобках — номер первого из углеродов при двойной связи, считая от COOH-группы; иногда указывается также характеристика двойной связи — *цис* (с) или *транс* (t).

** По международной системе СИ молекулярная масса измеряется в атомных единицах массы (а. е. м.). В биологии общепринято измерение молекулярной массы в дальтонах (Да) или килодальтонах (кДа).

формы или незаряженные формы жирных кислот имеют существенное значение.

Для устранения терминологических заблуждений J. Glantz и C. van der Vusse (1988) рекомендуют унифицировать названия различных жирных кислот следующим образом (табл. 4).

При всем разнообразии жирных кислот, встречающихся в природе, в мембранных липидах преобладают обычно две или три из них. В высших растениях присутствуют в основном *пальмитиновая*, *олеиновая* и *линолевая кислоты* (стеариновая почти не обнаруживается), а кислоты с четным числом атомов углерода от 20 до 24 встречаются крайне редко (за исключением эпидермиса листьев). В то же время некоторые растения содержат весьма необычные жирные кислоты: сложноцветные (например, маргаритки) — ацетиленовые жирные кислоты, бобы клещевины — оксикислоты и т. д.

Таблица 4

Номенклатура жирных кислот

Обычно используемый термин	Англоязычная аббревиатура	Рекомендуемое название
Свободные жирные кислоты	FFA	жирные кислоты
Неэстерифицированные жирные кислоты	NEFA	
Несвязанные жирные кислоты	UFA	
Эстерифицированные жирные кислоты	отсутствует	эфиры жирных кислот
Связанные (ковалентно) жирные кислоты	»	
Нековалентно связанные (с белком) жирные кислоты или их эфиры	»	связанные с белком жирные кислоты или их эфиры

В организме животных кроме пальмитиновой и олеиновой кислот содержатся большие количества *стеариновой кислоты*, а также и более высокомолекулярные кислоты с числом атомов углерода 20 и более. Как правило, они имеют четное количество атомов углерода; жирные кислоты с нечетным количеством атомов встречаются только в составе цереброзидов и ганглиозидов. Ненасыщенные жирные кислоты содержат двойные связи почти всегда в *цис*-конформации. У бактерий полиненасыщенные жирные кислоты, как правило, отсутствуют, но встречаются разветвленные, окси- и циклопропансодержащие кислоты. Для их мембран также характерно большое количество свободных жирных кислот, которые в мембранах растений и животных почти не обнаруживаются.

Полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов позвоночных животных находятся, как правило, у 11 атома углерода молекулы глицерина (см. рис. 1). Количество ненасыщенных жирных кислот в мембране определяет ее физико-химические свойства и может меняться при адаптации животных к различным условиям окружающей среды (Крепс, 1981).

Синтез ЖК с 16—18-углеродным скелетом осуществляется в цитоплазме, причем для образования углеродной цепи с четным количеством атомов используется ацетил-КоА, а нечетных — также и пропионил-КоА. По этой причине в тканях эмбрионов животных, где содержится много пропионата, синтез жирных кислот с нечетным числом атомов углерода более выражен, чем в тканях взрослых организмов. Разветвленные жирные изоациды образуются с использованием изобутирил- (для четного ряда) или изовалерил-коэнзима А (для нечетного ряда). В образование *антеизо*- (нечетных) жирных кислот вовлекается изолейцин.

Удлинение углеводородных цепей (синтез) ЖК осуществляется ферментными системами эндоплазматического ретикулума при участии НАДФН и малонил-КоА. Процесс удлинения может протекать также и в матриксе митохондрий. Образование двойных связей происходит под влиянием *десатураз*. Первая десатурация

осуществляется в цитозоле, в результате чего стеароил-КоА превращается в олеил-КоА, способствующий образованию *линолевой, линоленовой, арахидоновой* и других полиненасыщенных жирных кислот. У животных превращение олеил-КоА в линолеил-КоА не происходит, вследствие чего линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты являются для них незаменимыми.

Мононенасыщенные жирные кислоты — также субстраты для образования циклопропановых кислот, в ходе которого по месту двойной связи к их молекулам присоединяется дополнительный углеродный фрагмент S-аденозилметионина. Перегруппировка промежуточного продукта, получающегося в этой реакции, с последующим его восстановлением НАДФН приводит к образованию жирной кислоты с разветвленной цепью.

Ввиду высокой скорости обмена мембранных липидов синтез мембранных компонентов постоянно требует большого количества жирных кислот для образования диацилглицеридов. Из них образуются фосфатидная кислота, лежащая в основе обмена фосфолипидов, или галактозилдиглицерид, приводящий к *гликолипидам*. Жирные кислоты включаются также в обмен сфинганиновых соединений, обеспечивающих образование *церамида* и *сфингозина*. В обмен *стероидов* жирные кислоты вступают на последних стадиях, когда становится возможным образование эфиров холестерина и его аналогов. Ацилирование при этом протекает при участии специального фермента — лецитин-холестерин-ацилтрансферазы, а ацильная группа, используемая для образования эфира холестерина, происходит от молекулы фосфатидилхолина (лецитина), из которой при этом образуется *лизолецитин*.

Характеристика липидного состава некоторых мембран животных представлена в табл. 5 и 6.

Таблица 5

Липидный состав некоторых биологических мембран
(% различных липидов от общего их количества)

Липид	Эритроциты человека	Миелин человека	Митохондрии сердца быка	Мембраны <i>E. coli</i>
Фосфатидная кислота	1,5	0,5	0,0	0
Фосфатидилхолин	19,0	10,0	39,0	0
Фосфатидилэтаноламин	18,0	20,0	27,0	65
Фосфатидилглицерин	0,0	0,0	0,0	18
Фосфатидилинозит	1,0	1,0	7,0	0
Фосфатидилсерин	8,5	8,5	0,5	0
Кардиолипин	0,0	0,0	22,3	12
Сфингомиелин	17,5	8,5	0,0	0
Гликолипиды	10,0	26,0	0,0	0
Холестерин	25,0	26,0	3,0	0

Из табл. 5 видно, что основные липиды мембран животных клеток — фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин. Гликолипиды в большом количестве присутствуют в мембранах миеллина; в фотосинтезирующих ламеллах хлоропластов основным компонен-

Жирнокислотный состав фосфолипидов эритроцитов человека

Жирная кислота	Фх	Фэ	Фс	См
C _{16:0}	34	29	14	28
C _{18:0}	13	9	36	7
C _{18:1}	22	22	15	6
C _{18:2}	18	6	7	2
C _{20:4}	6	18	21	8
C _{24:0}	—	—	—	20
C _{24:1}	—	—	—	14

том также являются гликолипиды: диацилгалактозилглицерид (45%), диацилдигалактозилглицерид (30%) и диацилсульфоквиновозилглицерид (8%). Следовые количества фосфолипидов представлены лишь фосфатидилглицерином, содержащим необычную жирную кислоту — *транс*-гексадеценовую.

Аналогичен липидный состав мембран водорослей (хотя у них не встречается *транс*-гексадеценовой кислоты) и цианобактерий. В то же время мембраны других растительных органелл содержат в основном те же липиды, что и мембраны животных клеток. Главная особенность — низкое содержание или полное отсутствие сфингомиелина и высокий уровень полиненасыщенных жирных кислот.

Жирнокислотный состав мембранных липидов животных, в отличие от бактерий и растительных организмов, не так своеобразен, но более вариабелен. Из табл. 4 видно, что разные липиды характеризуются различным жирнокислотным составом. Систематические исследования показывают, что специфика этого состава сохраняется при условии неизменности среды обитания, преимущественного характера питания и т. д. Так, для жирнокислотного состава *фосфатидилхолинов* типичны *пальмитиновая* и *пальмитоолеиновая кислоты*, а для *фосфатидилэтаноламина* — еще и *арахидоновая*; *сфингомиелин*, как правило, содержит жирные кислоты более ненасыщенные, чем *фосфатидилсерин*, и т. д. Поскольку все фосфолипиды являются продуктами обмена фосфатидной кислоты, можно заключить, что именно жирнокислотный состав ее молекул будет определять, какой вид фосфолипида образуется из этого предшественника в данных условиях.

Изменение состава пищи, особенно ее липидной части, быстро приводит к изменению липидного состава мембранных структур. Так, для крыс показано, что возрастание в пище жирных кислот с ненасыщенными связями увеличивает жидкость мембран мозга, печени и слизистой кишечника, приводя к изменению отношения фосфолипидов к сфинголипидам, а также липидов к белкам.

Смена условий среды обитания при переходе к зимней спячке у гибернирующих животных, при изменении солености воды у проходных рыб и т. д., влияя на гормональный обмен, также изменяет жирнокислотный состав мембранных липидов в соответствии с условиями среды и потребностями организма. Гипотеза адаптационной роли мембранных липидов была выдвинута и обоснована Е. М. Крепсом (1981).

Наиболее резкие различия в жирнокислотном составе при сравнении мембран мозга рыб разных сред обитания обнаруживают *ганглиозиды*. В них же наиболее быстро выявляются изменения в наборе жирных кислот при смене температур и глубины обитания: понижение температуры и увеличение глубины синергично повышают содержание полиненасыщенных жирных кислот в составе ганглиозидов. В то же время изменений насыщенности жирнокислотного радикала сфингозинового основания не наблюдается. *Цереброзиды* и *сульфатиды* адаптационной изменчивости не проявляют.

Превращения холестерина, описанные ниже, протекают в мембранах эндоплазматического ретикулаума печени:



Обмен холестерина в организме связан с образованием и взаимопревращениями целого ряда биологически активных веществ, в частности *желчных кислот*. В организм человека холестерин поступает с пищей и всасывается в кишечнике (300—500 мг/сут). Кроме того, в дополнение к потребляемому с пищей в печени синтезируется 700—1000 мг/сут холестерина. Источником его являются ацетил-КоА и малонил-КоА, обеспечивающие образование β-гидрокси-β-метилглутарил-КоА, который затем восстанавливается в *мевалоновую кислоту* под влиянием гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазы. Этот фермент контролируется холестерином — повышение содержания холестерина в клетках печени подавляет как активность, так и новообразование гидроксиметилглу-

тарил-КоА-редуктазы. Недостаток холестерина снимает торможение этой реакции. Из мевалоновой кислоты образуется *скален*; начиная с этой стадии, возникающие соединения гидрофобны, их присутствие в водной фазе возможно лишь в комплексе со стерин-переносящими белками.

Т а б л и ц а 7
Время полужизни липидных компонентов мембраны

Компонент мембраны	Время полужизни в составе	
	миельна	митохондри- альных мем- бран
Цереброзиды	13 мес	2 мес
Сфингомиелин	10 мес	1 мес
Фосфатидилхолин	2 мес	2 нед
Фосфатидилэтаноламин	7 мес	4 нед
Фосфатидилсерин	4 мес	3 мес
Фосфатидилинозит	1 мес	2 дня

В процессе обмена холестерина возникает возможность образования витаминов группы *D* (холекальциферол и эргокальциферол), половых гормонов, минералокортикоида — альдостерона, глюкокортикоида — кортизола, антивоспалительного фактора — кортизона. Распад холестерина приводит к образованию желчных кислот: холевой, таурохолевой и гликохолевой. Высокое содержание холестерина в мембранах рассматривали ранее как запасную форму этого метаболита. Исследования последних 25 лет показали, что холестерин играет важную роль модификатора мембранного бислоя, регулируя упаковку и контролируя подвижность его компонентов.

Основную (структурную) роль в мембранном бислое играют фосфолипиды (см. рис. 3). Минорные компоненты мембран (иногда весьма необычного строения) выполняют своеобразные функции. Липиды мембран служат мишенью для действия специфических ядов. Так, обнаружено, что сульфатиды мембран мозга ответственны на рецепцию опиатов, а ганглиозид GM₂ выступает как природный рецептор холерного токсина. При связывании одной из субъединиц этого токсического белка с участком мембраны, содержащим олигосахаридные цепи молекул ганглиозида, инициируется высвобождение другой субъединицы токсина, активирующей фермент аденилатциклазу. В этом и заключается основное молекулярное действие холерного токсина, приводящее к неуправляемой наработке аденилатциклазой циклического АМФ.

Ганглиозиды мембран принимают участие в дифференцировке нейрональной ткани. Особенно высоко их содержание в сером веществе головного мозга; ганглиозиды других клеток, в том числе лимфоцитов, определяют видоспецифичность и регулируют межклеточные контакты. В клетках иммунокомпетентной системы различные гликолипиды принимают участие в

формировании иммунной реакции. При определенных состояниях организма некоторые ганглиозиды могут выступать модуляторами иммунного ответа: высвобождаясь с поверхности форменных элементов крови в среду, они способны блокировать действие клеток-киллеров, например при опухолевом росте. На фоне снижения иммунной реакции организма создаются более удобные условия для развития опухоли. В модельных системах таким действием, как обнаружено, обладают ганглиозиды GM₃ и GD₃. Увеличение содержания свободных форм этих соединений снижает защитные возможности организма.

Все мембранные компоненты многократно обмениваются в течение жизни клетки (табл. 7), время их жизни зависит от интенсивности функционирования мембраны.

1.1.2. Мембранные белки

Гидрофобные белки благодаря особенностям своей структуры легко встраиваются в фосфолипидный бислой. Для этого необходимо, чтобы температура среды была выше критической температуры ($T_{кр}$) для данного бислоя. Взаимодействие белка с фосфолипидной мембраной осуществляется в несколько стадий. Сначала происходит адсорбция белка на поверхности бислоя. Это изменяет конформацию белковой глобулы и индуцирует возникновение гидрофобного контакта между белком и ацильными цепями фосфолипидов. Затем белок внедряется в бислой. Глубина внедрения зависит от силы гидрофобных взаимодействий и от соотношения гидрофобных и гидрофильных областей на поверхности белковой глобулы.

Гидрофильные области белка взаимодействуют с примембранным слоем по одну или обе стороны мембраны. Таким образом, белковая молекула фиксируется в бислой с помощью взаимодействий двух типов — *электростатических* (на уровне полярных голов фосфолипидов) и *гидрофобных* (в толще бислоя). Такие белки рассматривают как интегральный компонент мембраны. Мембранные белки могут включать в свой состав липидные или углеводные фрагменты. Особенно велико содержание гликопротеинов в цитоплазматических мембранах. Углеводная часть их выступает наружу с внешней стороны мембраны.

Периферические белки мембран отличаются от интегральных меньшей глубиной проникновения в бислой и более слабыми белок-липидными взаимодействиями. Интегральные белки, как следует уже из самого их названия, так тесно связаны с мембранным бислоем, что изменение состояния этих белков передается на окружающие их липиды.

Деление мембранных белков на периферические и интегральные определяется их структурой, количеством гидрофобных аминокислот и их расположением в первичной структуре, т. е. всеми

теми свойствами, которые обеспечивают взаимодействие белка с бислоем. Периферические белки оказывают менее значительное воздействие на состояние и подвижность ацильных цепей фосфолипидов. Напротив, подвижность *аннулярных липидов*, которые непосредственно примыкают к интегральным белкам мембраны, сильно ограничивается вследствие их взаимодействия с белковой молекулой. Аннулярные липиды часто называют связанными (*boundary lipids*).

По характеру взаимодействия с мембраной белки подразделяют также на *монотопические*, *битопические* и *политопические* (рис. 6). Монотопические белки относятся к периферическим белкам, а би-

и политопические — к интегральным. Примером битопического белка является гликофорин, политопических — транспортные АТФазы, бактериородопсин.

Функциональная активность мембранных белков определяется их высокой конформационной лабильностью. В основе этого свойства лежит способность белковой молекулы осуществлять конформационный переход из напряженного (*tensed, T*) состояния в расслабленное (*relaxed, R*) и обратно: *R*—*T*-переход. Это приводит к изменению третичной, а часто и четвертичной структуры белка и изменяет взаимодействие белковых молекул друг с другом. Энергия конформационного

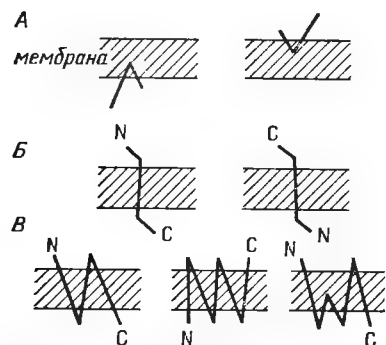


Рис. 6. Монотопическая (А), битопическая (Б) и политопическая (В) локализация белков в биомембране. Указана локализация N- и C-концов

перехода белков в мембране зависит от плотности упаковки (микровязкости) мембранных липидов, состояния непосредственно окружающих белок аннулярных липидных молекул.

Аннулярные липиды по своему поведению и подвижности отличаются от суммарного липидного бислоя. Белковые молекулы ограничивают подвижность «прилипающих» к их поверхности липидов, и аннулярный слой оказывается более упорядоченным.

Анализ белок-липидных взаимодействий в мембране позволяет выделить контакты четырех основных типов. Наиболее часто распространен случай, когда внедряющийся в бислой белок вызывает локальное возрастание упорядоченности аннулярного слоя; так действуют пептидный ионофор — *грамицидин*, *бактериородопсин* и многие другие интегральные мембранные белки.

Периферические белки, проникающие не на всю глубину бислоя, вызывают эластическую деформацию одной его стороны. Такое влияние на физико-химические параметры бислоя характеризуется определенным дальним действием. Именно им определяется облегчение взаимодействия мембранных рецепторов с гормонами типа инсулина.

Ярко выраженная гидрофобность белка может привести к резкому изменению градиента кривизны и деформировать бислой, как это имеет место в случае взаимодействия с мембраной цитохрома *b*₅. Наконец, сочетание гидрофильных и гидрофобных свойств белковой молекулы может обеспечить не только проникновение белка через бислой, но и существенное давление на него, приводящее к изменению геометрии бислоя — сжиманию одних частей и уширению других (например, в случае белка эритроцитарных мембран гликофорина).

Мембранные белки выполняют различные функции. Наиболее распространены белки-ферменты. В их число входят как интегральные белки (*мембранные АТФазы*), так и периферические (*ацетилхолинэстераза, кислая и щелочная фосфатазы, РНКазы*).

Белки-рецепторы и белки, определяющие иммунную реакцию клетки, — *антигены*, также могут быть как интегральными, так и периферическими компонентами мембраны. Часто рецепторы входят в состав более сложных мембранных комплексов, содержащих белки-исполнители. Например, холинорецептор воспринимает сигнал от нейромедиатора и передает его на белок-каналобразователь. Эта реакция открывает проницаемость мембраны для ионов и формирует возбуждающий потенциал.

Белки, примыкающие к мембране с цитоплазматической стороны, относятся к цитоскелету клетки (см. разд. 1.3). Строго говоря, они не являются компонентами мембраны. Но они могут прикрепляться к мембранным белкам. Так, белок полосы 3 эритроцитарных мембран объединяется в ансамбли с молекулами спектрина через специальный низкомолекулярный белок *анкерин*. Микротрубочки и микрофиламенты цитоскелета обеспечивают противодействие клетки изменению ее объема и создают эластичность. Основной белковый элемент цитоскелета — тубулин — способен агрегировать, образуя трубчатые структуры. Связь белков цитоскелета с мембраной не постоянна.

Из всех видов посттрансляционной модификации мембранные белки подвергаются главным образом ацилированию и гликозилированию. Ацилирование белка жирнокислотными радикалами сильно увеличивает его гидрофобность. В результате образуются *протеолипиды*. Протеолипиды миелина настолько гидрофобны, что их можно растворить только в органических растворителях. Иногда обнаруживается ковалентное присоединение к белкам диацилглицерина. В этом случае он присоединяется к белковой молекуле тиозфирной связью через N-концевой цистеин (как в пептидогликановом матриксе грамотрицательных бактерий). Жирные кислоты обычно присоединяются амидной связью к α -аминогруппам (показано для пенициллиназы грамположительных бактерий). Такого рода протеолипиды типичны и для мембран клеток высших животных.

Найдены также О- и S-эфиры жирных кислот с гликопротеинами. Чаще всего для этой цели используются миристоил ($C_{14:0}$) или пальмитоил ($C_{16:0}$). Ацилирование этими радикалами осуществ-

ляется по альтернативному пути, в первом случае образуется амидная связь, во втором — тиоэфирная. Миристоильный радикал присоединяется к белку через глицин (возможно, и лизин). Миристоильные протеолипиды могут быть как растворимыми, так и мембраносвязанными. Пальмитоилсодержащие протеолипиды в основном являются мембраносвязанными.

Исследование ацилирования в присутствии ингибиторов синтеза, транспорта и гликозилирования белков показало, что:

- 1) ингибиторы синтеза белка (циклогексимид и эметин) блокируют миристоилирование, но не сильно устраняют пальмитоилирование белковой цепи;
- 2) туникамидин — блокатор N-гликозилирования, не влияет на уровень миристоилирования;
- 3) монензин, который блокирует транспорт белков через аппарат Гольджи, не влияет на присоединение жирных кислот.

Следовательно, присоединение миристана происходит в процессе синтеза белка в рибосомальном аппарате, а пальмитата — после освобождения цепи от полисомы в другом компартменте клетки, возможно в аппарате Гольджи.

Изучение присоединения пальмитата к сialogликопротеинам показало, что оно предшествует терминальному гликозилированию. Исходя из этого, предлагаются различные объяснения биологического смысла посттрансляционной модификации белка: управление его гидрофобностью, регуляция процесса гликозилирования, который в свою очередь отражает созревание белка и формирование его функциональной активности (подробнее — см. разд. VII).

Недавно обнаружено, что тирозинкиназа, являющаяся продуктом сарк-гена P^{60} , синтезируемая мутантной линией клеток, содержит немиристоилируемый N-конец. Он сохраняет свою киназную активность, но не в силах вызывать морфологическую трансформацию клеток.

Ранее все клеточные белки делили на мембраносвязанные и цитоплазматические (растворимые). В связи с обнаружением белков с переменной гидрофобностью высказано предположение в возможном наличии в клетке *амфитропных белков*, способных существовать то в свободном, то в мембраносвязанном состоянии. В настоящее время изучаются механизмы, которые управляют ацилированием, регулируя способность амфитропных белков связываться с мембраной. Обнаружены амфитропные белки, модифицирующиеся за счет нековалентного присоединения жирных кислот или диглицеридов (табл. 8).

Большинство амфитропных белков локализовано в цитоскелете. Это означает, что системы, регулирующие их взаимодействие с мембраной, фактически определяют связь мембраны с цитоскелетом, прочность и конфигурацию клеточной поверхности. Контроль за состоянием амфитропных белков только начинается исследоваться. Ввиду того, что в качестве липидного компонента в этих протеолипидах выступают диацилглицериды и фосфатидилинозит-

Амфитропные белки и их гидрофобные партнеры

Белок	Липидный компонент	Вид связи
α -Актинин	диацилглицерин, жирные кислоты	нековалентная
Гельсолин	фосфатидилинозит-4,5-дифосфат	»
Винкулин	кислые фосфолипиды, пальмитат	»
Кальпактин (p36)	фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, миристан	ковалентная нековалентная
Спектрин	фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин	ковалентная нековалентная
Гликофорин	жирные кислоты	»
Анкерин	пальмитат	ковалентная

дифосфат, предполагают участие в процессе регуляции фосфолипаз и инозитидного цикла (см. раздел VI.1.3).

Время жизни мембранных белков составляет от двух до пяти дней. По этой причине в клетке существует механизм, обеспечивающий поставку вновь синтезированных молекул белка к соответствующим участкам мембраны. Синтез белка начинается на свободных рибосомах (рис. 7).

Рост пептидной цепи, начинающийся с N-конца, приводит к образованию сигнального пептида, который способен найти на мем-

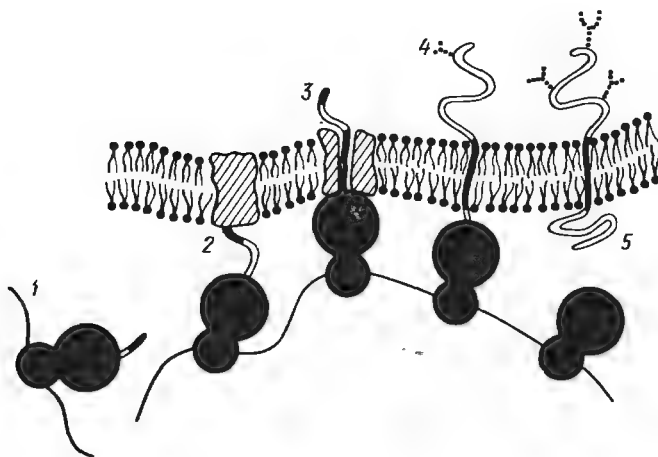


Рис. 7. Синтез мембранного белка. Образование пептидной цепи инициируется мРНК на свободной рибосоме, вначале образуется сигнальный пептид (1), способный обнаружить мембранный рецептор (2), который облегчает встраивание белка в мембрану (3). После встраивания в бислой пептид освобождается от сигнального конца, продолжая расти и одеваться углеводной «шубой» (4). По окончании синтеза рибосома высвобождается из связи с мембраной (5)

бране рецептор, облегчающий проникновение белка в бислой. По мере роста цепи пептид отсоединяется от рецептора, сохраняя связь с рибосомой, при этом последняя оказывается связанной с мембраной. На более поздних стадиях синтеза сигнальный участок, «помогавший» внедрению белка в мембранную структуру, отщепляется, к гидрофильной части молекулы присоединяются углеводные компоненты. По завершению синтеза рибосома отсоединяется от мембраны, а готовый белок переносится к месту своего функционирования. Однако его диффузия по мембране в латеральном направлении возможна лишь на короткое расстояние. Миграция белка в отдаленные районы клетки протекает в результате либо контактов между различными органеллами, в процессе которых они обмениваются мембранными компонентами, либо транспорта синтезированных в ретикулуме белков специальными одетыми клатрином («покрытыми») везикулами, отщепляющимися от аппарата Гольджи (см. разд. VII.3).

1.1.3. Углеводные компоненты

Углеводы в составе мембран обнаруживаются лишь в соединении с белками (*гликопротеины* и *протеогликаны*) и липидами (*гликолипиды*). В мембранах гликозилировано около 10% всех белков и от 5 до 26% липидов (в зависимости от объекта).

Углеводные цепи белков колеблются по составу от двухзвенных структур до разветвленных 18-членных полисахаридов весьма разнообразного состава, называемых гликанами. В них включаются глюкоза, галактоза, нейраминная кислота, фукоза и манноза. В составе соединительной ткани и межклеточного вещества обнаруживаются протеогликаны: углеводные компоненты в них сульфатированы. Их типичными представителями являются *хондроитинсульфат*, *дерматансульфат* и *гепарансульфат*. Углеводный компонент гликолипидов также сульфатирован. В этом случае олигосахара соединены с молекулами церамида, а функции, которые они осуществляют в клетке, аналогичны таковым у гликопротеинов и протеогликанов. Все три класса углеводсодержащих соединений называют **гликоконъюгатами** (табл. 9).

В соответствии с типом связей присоединяемые углеводные компоненты делят на О-гликаны и N-гликаны. В случае гликопротеинов в образовании гликозильной связи вовлекаются обычно аспарагиновая или глутаминовая кислота, серин, треонин, при образовании гликолипидов — церамид.

Углеводные компоненты мембранных структур в подавляющем большинстве открываются во внеклеточную среду. Их функции связаны с контролем за межклеточными взаимодействиями, поддержанием иммунного статуса клетки, обеспечением стабильности белковых молекул в мембране. Ниже приведены некоторые конкретные функции гликоконъюгатов.

В качестве наиболее распространенного примера гликопротеинов, содержащих N-гликаны, обычно приводят иммуноглобулины крови. Однако они, как и содержащие O-гликаны муцины слюны и слизи, — не мембранные гликопротеины. Типичным примером гликоконъюгатов, выполняющих свои функции в составе мембран, являются антигенные детерминанты групп крови. Они представлены как гликолипидами, так и гликопротеинами, в числе которых — известный гликофорин.

Т а б л и ц а 9

Состав и роль гликоконъюгатов клетки

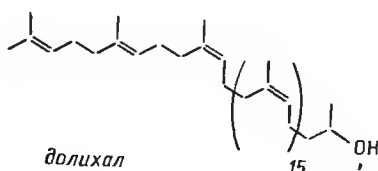
Наиболее распространенные моносахариды	Дополнительные компоненты		Локализация
	обычные	редкие	
В гликопротеинах глюкоза галактоза манноза глюкозамин* галактозамин* нейраминовая кислота* фукоза	белок	фосфат, сульфат	клеточный секрет, мембраны клеток и соединительная ткань
В протеогликанах галактоза ксилоза глюкуроновая кислота идуроногая кислота глюкозамин* галактозамин*	сульфат, белок		внечелочный матрикс и соединительная ткань
В гликолипидах глюкоза галактоза глюкозамин* галактозамин* нейраминовая кислота* фукоза	церамид	сульфат	мембраны клеток, минорные компоненты плазмы крови

* Ацилированы по N-концу.

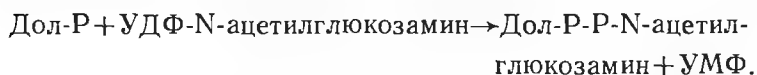
Важна роль углеводного компонента белковых молекул и в формировании сложных молекул со специфическими функциями — процессинге. Многие белковые молекулы, особенно биологически активные вещества (например, нейропептиды), синтезируются в виде крупных неактивных предшественников, которые затем расщепляются специфическими протеазами с формированием «зрелых» биологически активных продуктов. Деятельность протеаз контролируется уровнем гликозилирования белков. Так, многие белки, синтезируемые вначале как гликопротеины, в дальнейшем в результате процессинга теряют олигосахаридную часть.

В данной выше краткой картине образования и внедрения в мембрану белковых молекул показана необходимость формирования сигнальной последовательности в белковой молекуле, способной найти на мембране свой «рецептор». Часто в состав сигнального пептида включаются углеводные компоненты. В клетках, обработанных туникамицином, эндоплазматический ретикулум набухает. Он буквально переполнен негликозилированными белками, которые не могут проникнуть через мембрану.

Гликозилирование мембранных белков осуществляется при участии *долихола*. Долихолы (Дол) — семейство полиизопренолов с длиной цепи, варьирующей от C₈₀ до C₁₀₀. Впервые они были выделены из печени свиньи в 1963 г., но их отношение к транспорту углеводных цепей в процессе образования N-гликозилированных гликопротеинов показано лишь в 1978 г.



В варьирующих количествах долихол присутствует в мембранах многих клеток. Вероятно, в силу его способности нарушать регулярную упаковку бислоя он представлен в мембранах соединением с жирными кислотами или сахарами:



Последняя реакция ингибируется антибиотиком туникамицином.

По-видимому, из комбинации указанных реакций путем обмена и замещения в благоприятных условиях на цитоплазматической стороне мембраны образуется Дол-Р-Р-(N-ацетилглюкозамин)₂-(манноза)₅. Если стартовый комплекс образуется, он готов участвовать в процессе гликозилирования белка; он переносится в люмен эндоплазматического ретикула, где к нему присоединяются 4 остатка маннозы и 3 — глюкозы. Сформированный углеводный ансамбль переносится на N-конец гликозилируемого белка, а долихолфосфат освобождается для следующего цикла (рис. 8).

Таким образом, уровень долихолфосфата лимитирует скорость процессов гликозилирования в клетке, а пирофосфатаза Дол-Р — важный регулятор этого процесса.

В тканях животных долихол синтезируется в печени по пути, общему с холестерином:

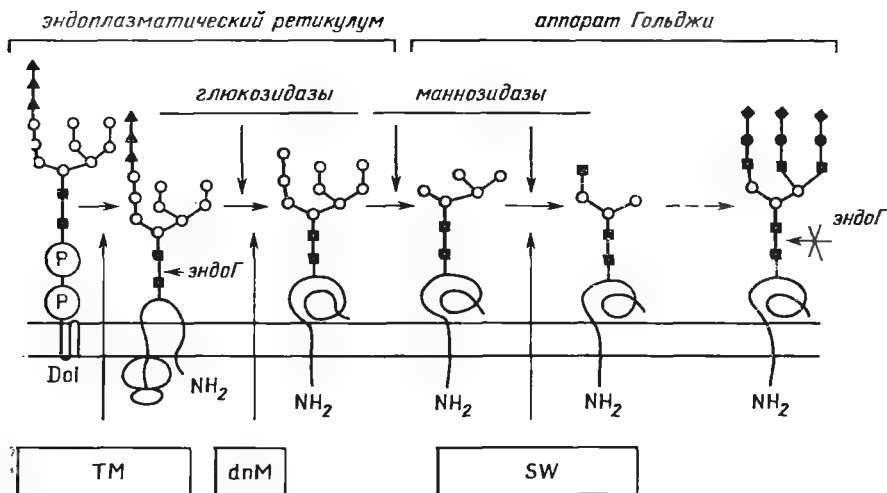


Рис. 9. Посттрансляционный процессинг N-связанных гликопротеинов и специфические ингибиторы реакций гликозилирования: 1 — туникамицин, 2 — дезоксириимидин, 3 — свайнсонин, 4 — эндогенная гиалуронидаза, 5 — долихол, 6 — N-ацетилглюкозамин, 7 — манноза, 8 — глюкоза, 9 — галактоза, 10 — сиаловая кислота

По окончании компоновки белка в бислое, как правило, большая часть гликозильной «шубы» отщепляется мембранной гиалуронидазой (рис. 9).

ВОПРОСЫ

1. Назовите основные функции биологических мембран.
2. Какие силы обеспечивают прочность липидного бислоя?
3. Какие физико-химические методы можно использовать для оценки белок-липидных взаимодействий в мембране?
4. Предложите схему эксперимента по выявлению асимметрии нативной мембраны; какие механизмы используют бактериальные и животные клетки для поддержания этой асимметрии?
5. Перечислите основные пути посттрансляционной модификации мембранных белков и приведите примеры ее биологического значения.

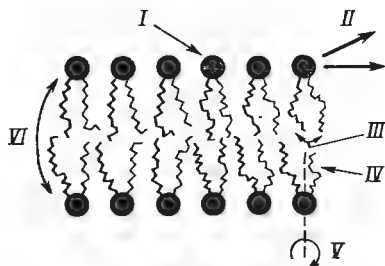
1.2. СТРУКТУРА БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

В основе современных представлений о структуре мембран лежит жидкостно-мозаичная концепция, выдвинутая С. Сингером и Дж. Никольсеном в 1972 г. Согласно этим представлениям, бислой является жидкой структурой, в которой образу-

щие его молекулы липидов способны осуществлять различного рода движения: *сегментальную подвижность, вращательные движения и латеральную диффузию* (рис. 10). С меньшей скоростью они способны к переходу на другую сторону бислоя и к выходу из него.

Рис. 10. Виды подвижности липидных компонентов в бислое:

I — изменение ориентации полярных голов, II — быстрая латеральная диффузия в двухмерном пространстве бислоя, III — быстрые колебания жирнокислотных цепей, IV — образование кинков и их продвижение по ацильным цепям, V — вращательная подвижность вокруг длинной оси, VI — медленный обмен между компонентами монослоев мембраны



Белки в бислое также весьма лабильны. Время *вращательной диффузии* для белка в бислое может составлять величины, меньшие 1 мкс. Латеральная подвижность белка определяется не только его свойствами, но и микровязкостью липидного окружения, фазовым состоянием липидов. Таким образом, подвижность белковых молекул и их ассоциация в мембране контролируются липидами. Слои липидов, примыкающие к белку (пограничные, или *аннулярные*, липиды), упорядочены, т. е. их подвижность (по сравнению со свободными липидами) ограничена временами порядка 10^{-5} — 10^{-7} с. Это на 2—3 порядка больше, чем подвижность липидов в безбелковом бислое.

Время обмена молекулами между аннулярным слоем и суммарным липидным фондом зависит также от структурированности мембраны, а значит, от температуры, жирнокислотного состава ее компонентов, характера взаимодействий молекул липидов друг с другом и т. д. Липиды способны образовывать упорядоченные области с общей «системой координат» — *кластеры*, в которых плотность упаковки может существенно отличаться от соседних с ними частей. Время жизни кластеров порядка 10^{-6} — 10^{-7} с, количество молекул в кластере — от нескольких десятков до сотен, а межкластерные зоны могут образовывать зоны дефектов, облегчающих проникновение в бислой модификаторов.

Важная особенность мембраны — *асимметрия бислоя*, создаваемая за счет действия внутриклеточных ферментов, различий ионного состава цитоплазмы и интерстициальной жидкости, а также особенностей структуры молекул фосфолипидов и асимметричной локализации белков и липидов в бислое. Асимметрия бислоя — это фактор, обеспечивающий создание градиента кривизны, складок, сморщиваний, отшнуровку частей мембраны в виде везикул.

Концепция жидкостно-мозаичного состояния мембран находит свое подтверждение в исследовании мембранной структуры современными физическими методами.

1.2.1. Динамическое состояние липидов в бислое

Растянутая углеводородная цепь жирной кислоты, содержащая 18 углеродных атомов, имеет длину 2,0 нм. По этой причине можно было бы предположить, что бислой, составленный из фосфолипидов, жирные кислоты которых содержат 18—20 углеродных радикалов, должен иметь толщину более 4,0 нм. Однако реальная толщина мембраны редко превышает это значение, что указывает на то, что жирнокислотные радикалы бислоя не распрямлены полностью, а образуют рыхлые структуры, в связи с чем площадь мембраны несколько больше, чем следует из расчета теоретического пространства, приходящегося на одну молекулу фосфолипида. Такая упаковка бислоя вызвана многими факторами.

Наличие в мембране в составе фосфолипидов *цис*-изомеров жирных кислот, разветвленных или содержащих циклические кольца углеводородных цепей, а также высокая скорость вращения вокруг С—С-связей жирнокислотных радикалов делают бислой достаточно рыхлым.

Потенциальный барьер вращению вокруг единичной С—С-связи составляет 8—15 кДж/моль, а поворот вокруг двойной С=С-связи — примерно 150 кДж/моль. Из уравнения Аррениуса можно оценить частоту вращения вокруг единичной С—С-связи: она составляет 10^{10} с^{-1} , вокруг двойных С=С-связей — 10^8 с^{-1} . Различные конфигурации молекул жирных кислот, возникающие при поворотах (вращениях) вокруг единичных С—С-связей, называют *ротамерами*, или *конформерами*, а изменение конформации молекулы за счет таких поворотов носит название *транс-гош*-изомеризации. Поскольку *транс-гош*-переход оценивается примерно в 2 кДж/моль, его вероятность очень велика и сильно увеличивается при возрастании температуры. При переходе двух соседних *транс*-конфигураций в *гош*-конформацию образуется складка, или *кинк*. Образование дефектов такого рода иллюстрирует рис. 11.

Возможность образования таких структур обеспечивает возникновение подвижных дефектов, способных захватывать целые блоки мембраны — кластеры. Их концентрация и подвижность зависят от температуры. Границы кластеров определяются их упаковкой, т. е. общими осями симметрии, одинаковым параметром упорядоченности, общим углом наклона цепей.

На рисунках и схемах цепи фосфолипидов в бислое, как правило, представляют скошенными относительно перпендикулярной оси мембраны. Угол наклона цепей определяется природой полярной головы молекулы: наклон возникает в том случае, если объем гидратированной головы молекулы больше площади сечения ее хвостовой части. В случае, когда эти величины равны (например, для фосфатидилэтаноламина), скоса практически не наблюдается. Таким образом, угол наклона молекул фосфолипидов в мембране определяется природой фосфолипида и может служить критерием отбора при образовании кластеров в бислое. Наличие перечисленных особенностей обеспечивает определенную рыхлость упа-

ковки (жидкость, или текучесть) мембранного бислоя при нормальных условиях. Эта жидкость определяет функциональную динамичность мембраны.

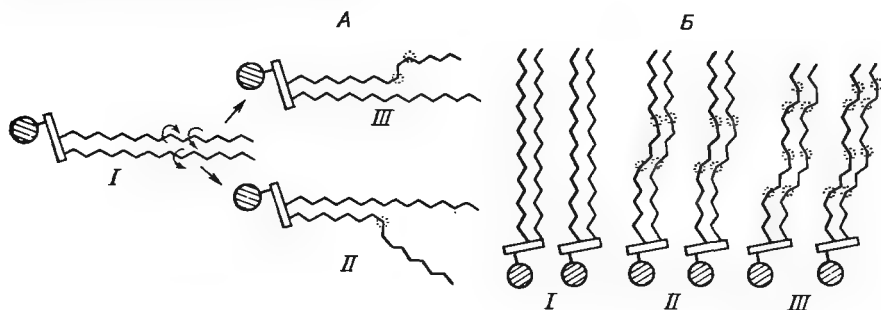


Рис. 11. Образование дефектов в мембранном бислое: А — обе жирнокислотные цепи молекулы фосфолипида находятся в *транс*-конфигурации, вращение вокруг С—С-связей, указанное круговыми стрелками, ничем не ограничено (I); в результате несогласованного вращения образуется скошенная (*gauche*-) конформация (II) или кинк (III); Б — влияние кинков на упаковку бислоя: I — кинки отсутствуют, II — один кинк на жирнокислотную цепь, III — два кинка на жирнокислотную цепь

Следовательно, динамическое состояние бислоя с высокой подвижностью его компонентов определяется одновременно несколькими факторами. С одной стороны, это вращательная подвижность отдельных молекул фосфолипидов. Затем, это *транс-гаш*-ротамеризация углеводородных цепей. Вблизи метильного конца она осуществляется для каждой молекулы независимо, но с приближением к полярной голове и возрастанием плотности упаковки (особенно начиная с 9-го углеродного атома, ближе которого к поверхности бислоя почти не встречается *цис*-двойных связей) *транс-гаш*-ротамеризация может осуществляться только для нескольких цепей одновременно. При этом упаковка бислоя нарушается много меньше, если в каждой цепи происходят одновременно два *гаш*-поворота и образуется кинк. Синхронные *транс-гаш*-превращения могут быть представлены как движение кинков вдоль цепи. Вместе с этим движением через бислой возможно проникновение молекул гидрофильных веществ.

Выраженные когезионные взаимодействия между цепями в бислое определяются в основном первыми 8—9-метиленовыми группами углеводородной цепи. *Цис*-двойные связи в жирнокислотных цепях почти никогда не встречаются выше уровня С₉. По этой причине С₁- и С₂-углеводородные цепи в молекуле фосфолипидов оказываются неравнозначными. Обычно из двух цепей, присоединенных к глицериновому остову, лишь принадлежащая С₂-углеродному атому имеет двойные связи, обеспечивающие создание более рыхлой упаковки бислоя. Перемещение ненасыщенной жирной

кислоты из положения C_2 в положение C_1 (обмен жирнокислотными радикалами внутри молекулы фосфолипида) позволяет достичь более плотной упаковки. Действительно, для 18:0/18:1-фосфатидилхолина критическая температура фазового перехода составляет 3°C , а для 18:1/18:0-фосфатидилхолина — 22°C .

Существование ассоциатов фосфолипидных молекул с однородно наклоненными цепями, организованными более упорядоченно, чем их окружение (*кластеров*), было предсказано Б. Мак-Фарландом и Г. Мак-Коннелом. В 1971 г. наличие таких ассоциатов с временем жизни 10^{-8} с было показано в экспериментах со спин-мечеными жирными кислотами, включаемыми в лецитиновые бислои.

1.2.2. Фазовые переходы

В водной среде структуры, образуемые фосфолипидами (ламеллярные, мицеллярные, гексагональные и др.), ведут себя как анизотропные жидкости, обладающие признаками упорядоченности, т. е. жидкие кристаллы. Таким структурам присущи лиотропный мезоморфизм (зависимость состояния от гидратации) и термотропный мезоморфизм (зависимость структуры от температуры). Оба свойства связаны между собой. Фазовые переходы липидов, осуществляющиеся по типу «гель — жидкий кристалл», происходят при температуре ($T_{кр}$), величина которой зависит от содержания воды в системе. $T_{кр}$ достигает минимума, как только общее содержание воды превышает то количество, которое могут связывать липидные структуры. В то же время при температуре выше $T_{кр}$ при недостатке воды липиды могут находиться в упорядоченном состоянии. Фазовая диаграмма для яичного лецитина, характеризующая соотношение различных мезоформ липида в разных условиях, представлена на рис. 12.

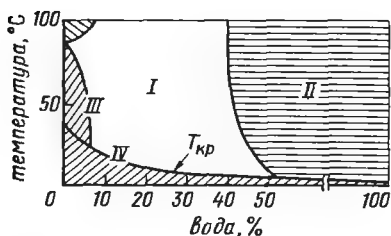


Рис. 12. Фазовая диаграмма смеси яичного лецитина с водой:

I — жидкокристаллическое состояние, бислой; II — двухфазная система вода: бислойные структуры; III — область сосуществования ламеллярных и гексагональных структур; IV — гель. $T_{кр}$ — кривая температуры фазового перехода

Примером того, как существенно влияет вода на фазовые переходы, является модификация фазового состояния мембраны под влиянием перекисного окисления липидов. Наблюдающееся в результате перекисного окисления мембранных липидов снижение $T_{кр}$ объясняется увеличением содержания воды в бислое.

Гидратация бислоя зависит от присутствия заряженных фосфолипидов, так что она может меняться, например, при действии липидпереносящих белков. Однако наиболее сильно гидратация бислоя изменяется при индукции перекисного окисления (Владимиров и др., 1983). Образующиеся в качестве промежуточных продуктов гидропероксиды являются высокогидрофильными веществами, они эффективно разрыхляют бислой, увеличивая доступность гидрофобных доменов для воды. Именно по этим причинам перекисное окисление липидов имеет такое «разрушительное» влияние на мембранные структуры (Каган, Орлов, 1986) (подробнее см. разд. VIII).

В момент фазового перехода бислоя происходит несколько одновременных событий: возрастает подвижность полярных $-N^+-(CH_3)_3$ -групп; увеличивается вращательная подвижность $C-C$ -связей, что приводит к облегчению *транс-гош*-перехода и образованию кинков; увеличивается скорость латеральной диффузии молекул. Следствием этого являются два важных обстоятельства: изменение геометрических размеров бислоя, которое объясняется латеральным расширением площади, занимаемой каждой молекулой фосфолипидов, и увеличение гидрофобного объема мембраны (рис. 13).

Благодаря неодновременности проявления этих свойств в ходе фазовых перестроек бислоя более упорядоченные области мембраны сосуществуют с уже «расплавленными» — наблюдается фазовое разделение (рис. 14). В этих условиях для мембраны характерно существование разного рода «дефектов», индуцирующих взаимодействие белковых молекул друг с другом, встраивание в бислой соединений, повышение проницаемости для ионов и т. д.

Термोटропные переходы в однородном бислое — пример *кооперативных перестроек*; при этом длительность температурного интервала перехода обратно пропорциональна кооперативности. Для мультислоев дипальмитоилфосфатидилхолина $\Delta T_{кр}$ составляет $0,5^\circ C$, для его бислоя — $\sim 7^\circ C$, для гетерогенных биологических мембран она может составлять еще большую величину. Уширение температурного интервала фазового перехода характеризует уменьшение размеров кооперативной единицы. Именно это наблюдается при встраивании белка в бислоиные структуры, способствующем бислою гетерогенность и снижающим его кооперативность (Конев, 1987).

Фазовые переходы, индуцируемые температурой, — объективная характеристика бислоя, состоящего из одного или нескольких (двух или трех) компонентов. Эти переходы могут быть измерены с помощью разнообразных методов. В случае гетерогенных систем, однако, эти методы дают результаты, не поддающиеся однозначной интерпретации.

Описанные фазовые переходы в мембране индуцируются не только изменениями температуры. Они могут быть вызваны сдвигом рН среды, электрическим потенциалом, двухвалентными катионами, способствующими образованию кластеров определенных

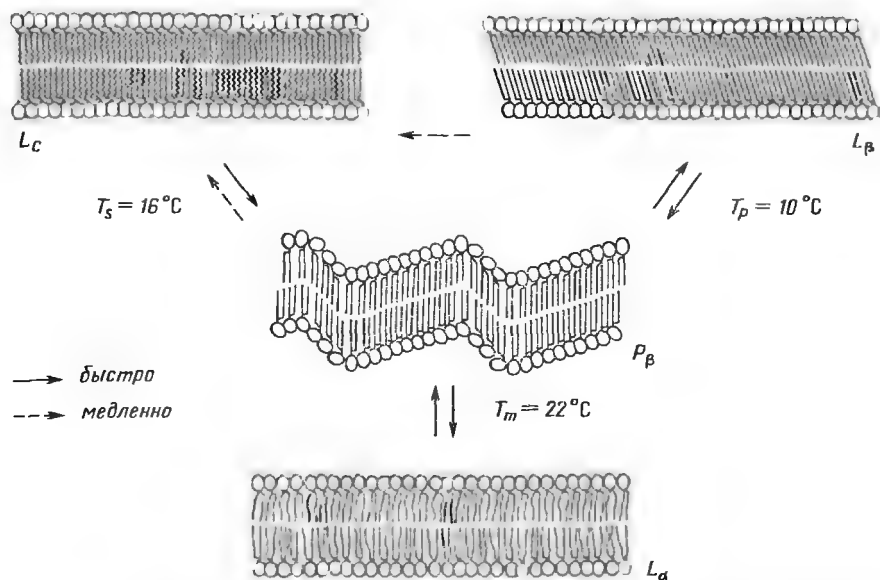


Рис. 13. Схематическое изображение четырех фазовых состояний ламеллярного бислоя, образованного чистым димиристоилфосфатидилхолином. Сплошная стрелка обозначает быстрые (порядка минут или меньше), а пунктирная — медленные (порядка месяцев) переходы (Sackman et al., 1988)

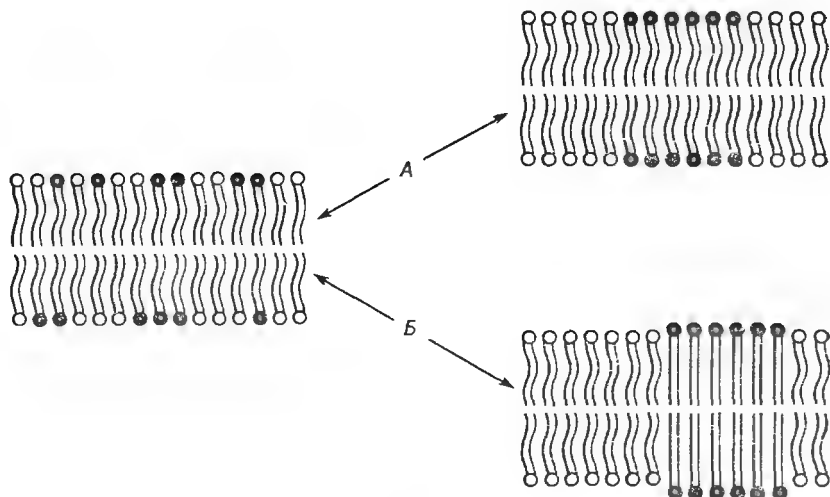


Рис. 14. Разделение фаз в гетерогенном бислое (А) с одновременным фазовым переходом части бислоя (В) под влиянием температуры

фосфолипидов и разделению фаз; фазовые переходы сопровождаются действием гормонов на биологические мембраны. В то же время исследование термотропных переходов имеет не только теоретическое значение: переходы такого рода осуществляются в биологических системах при подготовке животных к *гибернации* или выходе из зимней спячки, при термоадаптациях, адаптации мигрирующих рыб к морской воде и т. д.

Кроме переходов типа «гель — жидкий кристалл» липиды могут претерпевать превращения другого рода, приводящие к образованию гексагональной фазы H_{II} (рис. 15). Эти небесшлойные структуры легко образуют короткоцепочечные фосфолипиды с полярными головами (*фосфатидная кислота, фосфатидилсерин*). Повышение температуры, увеличение ненасыщенности жирнокислотных цепей, высокая ионная сила при щелочном pH, а также понижение гидратации бислоя способствуют образованию в нем гексагональных структур. Переход отдельных участков бислоя в фазу H_{II} приводит к нарушению целостности мембраны, формированию каналов проницаемости и т. д.

В искусственных мембранах переходы такого рода были зарегистрированы различными методами. В нативных мембранах, вероятно, они также могут образовываться. Для мембран хлоропластов переходам бислоя в гексагональную H_{II} -фазу приписывается важная регуляторная роль. Предполагают, что в мембранах саркоплазматического ретикулума мышц такие переходы могут индуцироваться в результате ферментативного обмена жирнокислотными цепями между длинноцепочечными фосфатидилсерином и короткоцепочечным фосфатидилхолином.

В мембранах эубактерий обнаруживается большое количество липида, склонного к образованию гексагональных структур — *плазменилэтаноламина*. Превращение его в глицероацетальплазмалоген препятствует образованию фазы H_{II} (см. рис. 4; табл. 2). Обратная реакция, выражающаяся в увеличении ненасыщенности мембранных компонентов и «разрыхлении» ее структуры, индуцирует образование гексагональной фазы в мембране (рис. 16).

В мембранах бактерий, обогащенных бифитанильными тетраэфирами и насыщенными жирнокислотными цепями с циклическими кольцами, фазовые переходы типа $L_{\alpha} \leftrightarrow L_{\beta}$ или $L_{\alpha} \leftrightarrow H_{II}$ затруднены. Их мембраны реагируют на внешние факторы, демонстрируя фазовое разделение, аналогичное изображенному на рис. 14.

Характерная особенность биологических мембран — различный состав липидов по обе стороны бислоя (рис. 17). Известно несколько механизмов, обеспечивающих асимметричное распределение фосфолипидов в мембране. Один из них связан с термодинамической вероятностью распределения липидов в соответствии со стереоконфигурацией их молекул. Действительно, при приготовлении липосом из смеси фосфолипидов их бислой будет характеризоваться несимметричным распределением компонентов. Во внешней части бислоя при формировании липосом оказывается больше фосфатидилхолина, а во внутренней —

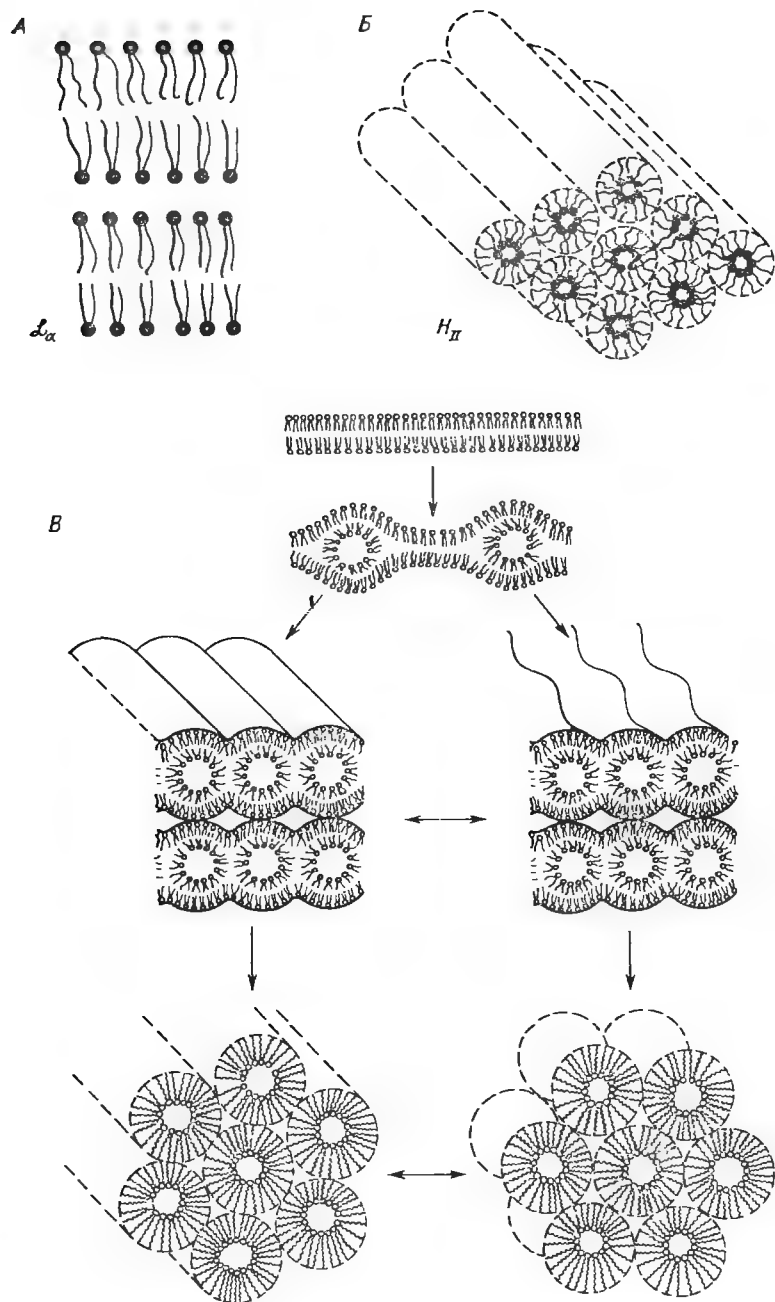


Рис. 15. Структуры, образуемые в водных суспензиях липидами, склонными к созданию ламеллярных образований (А), небислоиных гексагональных образований (Б) и смесью образующих и не образующих бислоя липидов (В) (Quinn, 1986)

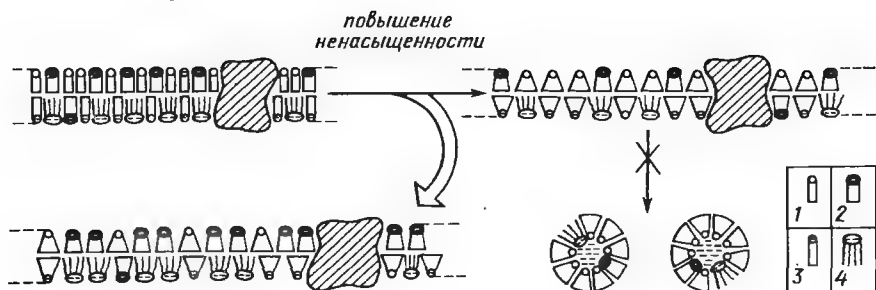


Рис. 16. Пример, иллюстрирующий регуляцию липидного состава у бактерий. Культура *S. butyricum* выращивалась на смеси насыщенных и ненасыщенных жирных кислот (вверху слева). Асимметрия липидного бислоя выражена в том, что около 80% фосфатидилэтаноламина (1) и около 90% глицероацетальплазмил-этаноламина (2) находятся во внешней части бислоя. Большинство фосфатидилглицерина (3) и кардиолипина (4) обнаруживаются во внутреннем моно-слое бислоя. Когда клетки выращиваются в среде с *цис*-мононенасыщенными жирными кислотами в отсутствие биотина, объем, занимаемый жирнокислотными цепями липидов, возрастает, конфигурация фосфатидилэтаноламина становится более конической, что увеличивает его тенденцию к образованию H_{II} фазы. В этих условиях клетка стремится превратить фосфатидилэтаноламин в глицероацетальплазмил-этаноламин, чтобы увеличить эффективный размер полярной головы и снизить эту тенденцию (внизу слева) (Goldfine, Langworthy, 1988)

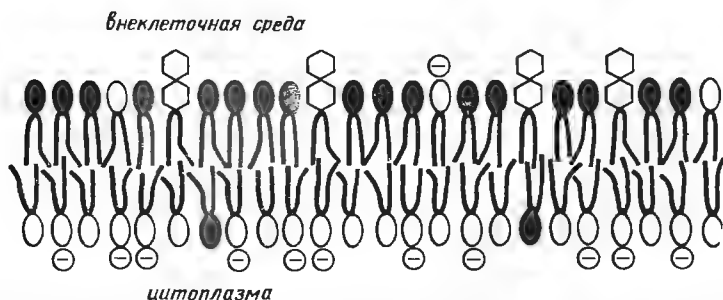


Рис. 17. Иллюстрация асимметрии липидного бислоя, организованного фосфо- и гликолипидами. Гликолипиды изображены с гексагональными полярными группами, холестерин не показан

фосфатидилэтаноламина; это обстоятельство облегчает образование изгибов, формирует градиент гибкости (табл. 10).

Второй механизм реализуется за счет различий в составе среды по обе стороны бислоя в условиях нативной клетки. С внеклеточной стороны мембрану омывает среда с высоким содержанием Na^+ и Ca^{2+} , со стороны цитоплазмы мембрана контактирует с Mg^{2+} и K^+ . Различия ионного состава вне- и внутриклеточной среды вносят вклад в создание и поддержание изгибов.

Самопроизвольное распределение фосфолипидов в липосомах (Thompson, 1977)

Исходные компоненты	Исходное молярное соотношение	Молярное соотношение	
		во внешнем слое	во внутреннем слое
Фосфатидилглицерин/фосфатидилхолин	1,0	2,0	0,33
Фосфатидилэтаноламин/фосфатидилхолин	1,0	0,65	3,0
Холестерин/фосфатидилхолин	1,0	0,89	1,3

Асимметрия бислоя обеспечивается также и ферментами липидного обмена и липидпереносящими белками. Последние представляют собой группу белков различной специфичности — от высокоспецифичных, обеспечивающих обмен одного-двух компонентов мембраны, до сравнительно мало специфичных, связывающих и переносящих к мембранам (или от них) липиды различных классов. Перенос липидных молекул осуществляется в виде их комплексов с этими белками-переносчиками; при этом белок-липидные комплексы становятся более гидрофильными.

К ферментам, поддерживающим и создающим асимметрию мембраны, относятся главным образом *липазы*, система обмена холестерина, а также *метилазы* фосфатидилэтаноламина. Метилирование фосфатидилэтаноламина с превращением его в фосфатидилхолин осуществляется в два этапа: образование монометилфосфатидилэтаноламина под влиянием метилтрансферазы I и образование фосфатидилхолина под влиянием метилтрансферазы II. Ферменты эти расположены на разных сторонах бислоя. Фосфатидилэтаноламин, как и его предшественник фосфатидилсерин, находится преимущественно на внутренней стороне бислоя. В этой же области обнаруживается и метилтрансфераза I.

Метилирование побуждает монометилфосфатидилэтаноламин перемещаться с внутренней стороны бислоя на внешнюю, где под влиянием метилтрансферазы II завершается его превращение в фосфатидилхолин. Этот процесс приводит к локальному снижению микровязкости («разупорядочиванию») бислоя, благоприятствует увеличению латеральной диффузии белков, вызывает кластеризацию рецепторов, сборку олигомерных белковых ансамблей в мембране и т. д. Метилирование фосфатидилэтаноламина является «сигналом», способным «запускать» функционально важные мембранные процессы: связывание рецепторов с лигандами, освобождение медиаторов из синаптических окончаний и т. д.

Во фракциях сарколеммы сердца и саркоплазматического ретикулума скелетных мышц обнаружена способность к обратимому ферментативному превращению фосфатидилэтаноламина в фосфатидилхолин. Эта реакция контролирует *микровязкость* и *градиент гибкости бислоя*, а значит, и условия работы мембранных ферментов. Показано, что превращение фосфатидилхолина в фосфатидилэтаноламин ингибирует Са-АТФазу ретикулума и эритроци-

тов, активирует Na, К-АТФазу микросом мозга. Есть основания считать, что этот механизм регуляции существует и в клетке.

Кроме различий в заряде молекул фосфолипидов и различной гидратации их полярных голов по обе стороны бислоя определенный вклад в создание мембранной асимметрии вносит также асимметричное расположение в мембране молекул интегральных белков.

1.2.3. Модификация бислоя белками

Внедрение белка упорядочивает фосфолипидный бислой, делая его структуру более жесткой. Считают, что это происходит за счет «прилипания» и ограничения подвижности фосфолипидных молекул аннулярного слоя.

Результаты, указывающие на снижение подвижности аннулярных липидов относительно суммарной липидной фазы, получены разными методами. Флуоресцентный анализ свидетельствует о повышении микровязкости бислоя при внедрении в него белковых молекул. ЭПР-спектроскопия обнаруживает ограничение подвижности зондов в бислое с присутствующими в нем белками. Растворение мембранных белков неионными детергентами приводит к получению сольubilизированных белок-липидных комплексов. Вероятнее всего, это комплекс белка с аннулярными липидами.

Изолированные индивидуальные мембранные белки можно реконструировать в липосомы с разным соотношением фосфолипид:белок и исследовать ферментативные свойства и физико-химические параметры бислоя в зависимости от того, какое количество молекул липида приходится на 1 молекулу белка. При этом проявляются различия в поведении липидов, не связанных с белком, и липидов, непосредственно примыкающих к белковой глобуле.

На рис. 18 приведены данные, характеризующие наличие аннулярного слоя липидов при реконструкции бактериородопсина. Внедрение бактериородопсина в липосомы из дипальмитоилфосфатидилхолина устраняет «предпереход» (T_1) на кривых, получаемых с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии, и расширяет интервал температур ($T_{кр}$), где наблюдается фазовый переход липида. При увеличении количества белка в пробе (снижение соотношения липид:белок) интервал перехода в еще большей степени расширяется, а высота пика снижается. Следовательно, часть молекул липида не включается в фазовые перестройки. При молярном отношении липид:белок менее 25 фазовый переход не регистрируется вообще (рис. 18, А). Другими словами, около 20 молекул дипальмитоилфосфатидилхолина так тесно связаны с каждой молекулой бактериородопсина, что не вовлекаются в термoиндуцированные переходы.

Аналогичные результаты получены при измерении поляризации флуоресценции гидрофобного зонда дифенилгек-

сатриена, величина которой соответствует упорядоченности бислоя. При температурах выше критической в суспензии димиристоилфосфатидилхолина поляризация флуоресценции мала (0,12), что соответствует высокой жидкости фосфолипида. Встраивание бактериородопсина увеличивает поляризацию флуоресценции до тех пор, пока при данной концентрации зонда все его молекулы не окажутся в окружении аннулярных липидов. При этом величина поляризации флуоресценции возрастает до 0,23 (рис. 18, Б). Эти опыты дают возможность оценить различия в упорядоченности свободного от белка бислоя и аннулярного липидного окружения. Они позволяют рассчитать количество молекул липидов, окружающих каждую молекулу бактериородопсина (оно равно 22).

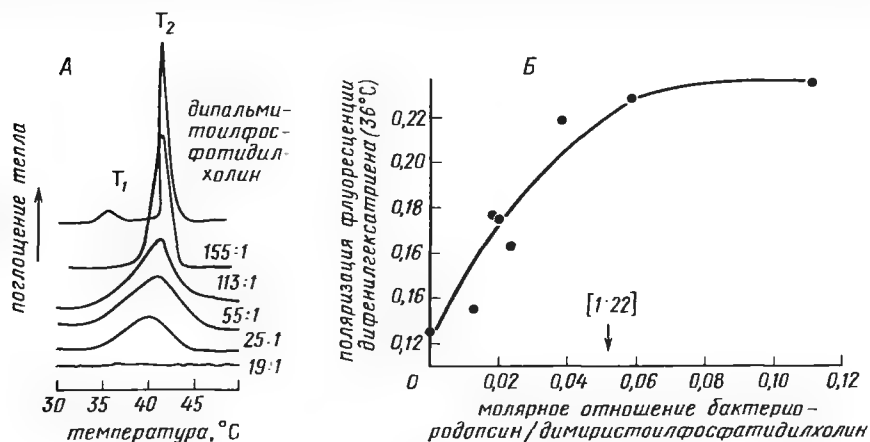


Рис. 18. Влияние белка на фазовые переходы липидного бислоя, измеряемые с помощью различных методов: А — дифференциальная сканирующая калориметрия смеси дипальмитоилфосфатидилхолина с бактериородопсином (мольное соотношение липид:белок указано над термограммами); T_1 — температура предперехода, T_2 — температура фазового перехода. Б — поляризация флуоресценции 1,6-дифенилгексатриена при разных мольных соотношениях белок:липид. Стрелка указывает на область насыщения аннулярного слоя вокруг молекулы бактериородопсина (22 молекулы липида на 1 молекулу белка) (Chapman, 1985)

Подобные данные были получены и для других мембранных белков. Так, найдено, что количество молекул фосфолипидов в аннулярном слое цитохромоксидазы равно 28—30 и соответствует ее молекулярной массе и размерам. Белковую молекулу массой 120—150 кДа должны окружать 30—32 молекулы липидов. Это и было найдено для Na, К-АТФазы.

Однако в последнее время представления о существовании аннулярных липидов стали подвергаться критике. Оказалось, что делипидированные ферменты активируются аннулярными липидами (как по отдельности, так и в разных соотношениях) не более чем на 10—30%. Многие неаннулярные липиды оказывают луч-

шее действие на восстановление ферментативной активности мембранных липидов после удаления липидного окружения. Более того, ряд детергентов также эффективно восстанавливает функциональную активность белка (Акимов, Мельгунов, 1981), причем степень реактивации коррелирует с величиной гидрофильно-липидного баланса детергентов.

Это означает, что гидрофобное окружение белков не обязательно должно быть специфическим. Изучение подвижности аннулярных липидов в мембранных препаратах Са-АТФазы показало, что вокруг белка не существует долгоживущего слоя липидов, по крайней мере при температуре выше $T_{кр}$, необходимой для функционирования мембранных ферментов теплокровных. Время обмена «прочно связанных» липидов с соседними молекулами составляет величину порядка 10^{-4} — 10^{-5} с; это несоизмеримо меньше продолжительности одного ферментативного цикла. Следовательно, аннулярные липиды могут многократно обмениваться с общей липидной фазой уже в течение одного реакционного цикла и на его ход влиять не могут.

Действительно, если контролировать сольюбилизацию мембранных фосфолипидов детергентами с помощью высокочувствительных методов, можно убедиться, что повышение концентрации детергента экстрагирует из нативной мембраны все имеющиеся там липиды с одинаковой скоростью, не различая прочно связанные (аннулярные) и свободные липиды (рис. 19). Более того, использование спин-меченых фосфолипидов в процессе реконструкции различных мембранных ферментов позволило измерить скорость обмена молекул фосфолипидов между аннулярным слоем и окружающими липидами. Для разных белков обнаруживается своя доля иммобилизованного липида. По вытеснению метки из аннулярного слоя при добавлении немеченого липида можно определить сродство каждого липида к поверхности белка. Характерно, что значения стехиометрии связывания белком пограничных липидов, измеренные этим методом и рассчитанные из геометрических размеров молекулы белка, практически совпадали.

Было обнаружено, что для различных реконструированных белков (*цитохромоксидазы, родопсина, Na, K-АТФазы, протеолипида миелина*) ряды убывающего сродства фосфолипидов повторялись, т. е. сродство разных фосфолипидов к белку определяется не спецификой белков, а спецификой липидных молекул (Marsh, 1986).

Значит ли это, что характер пограничного слоя липидов вообще не влияет на функцию мембранных белков? Хотя пограничные липиды и обмениваются с липидами всей мембраны, обмен осуществляется между липидами, имеющими определенную структуру полярной головы, длину жирнокислотного хвоста и характер его насыщенности. В каждый момент времени вокруг белка находят-ся специфические липиды, которые способны к тесному взаимодействию с белковой молекулой. Таким образом, аннулярный

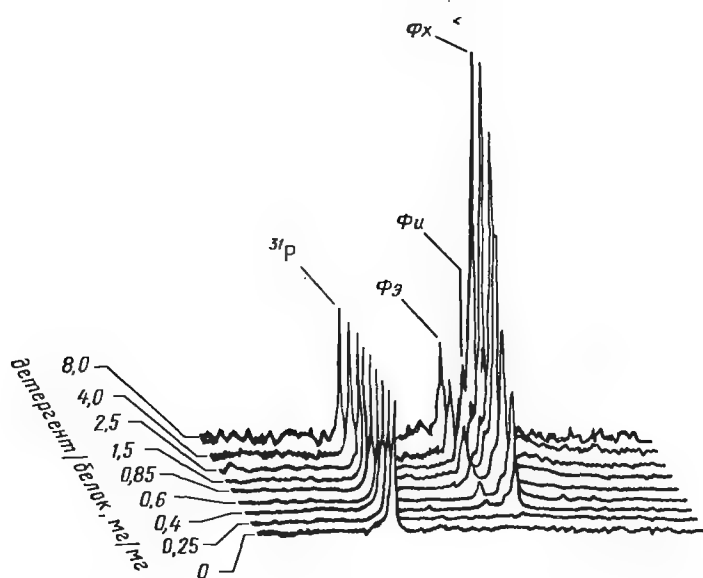


Рис. 19. ^{31}P -ЯМР спектроскопия мембран саркоплазматического ретикулума в присутствии нарастающих концентраций C_{12}E_8 (Roux, Champeil, 1984): Фэ — фосфатидилэтанолламин, Фи — фосфатидилинозит, Фх — фосфатидилхолин; пик, соответствующий ^{31}P , указывает на сравнимость приведенных кривых друг с другом

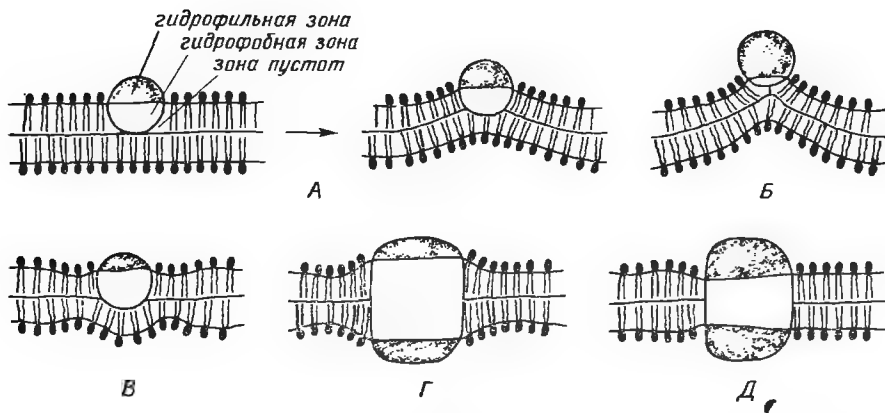


Рис. 20. Взаимодействие интегральных белков с липидным бислоем. Для плотной (без пустот) упаковки белка в бислой последний должен быть способен изменять свои размеры и кривизну (А—В). При этом соотношение гидрофобных и гидрофильных областей в молекуле интегрального белка будет влиять на толщину бислоя (Г—Д)

слой составляет ту конформационно «удобную» среду, в которой осуществляется функционирование фермента, и наличие относительно быстрого обмена аннулярных липидов с общей фазой не меняет картины.

К аннулярному окружению относится различное количество липидных слоев в зависимости от условий среды. Так, кольцо аннулярных липидов с ростом температуры, по-видимому, сжимается, при понижении температуры оно возрастает, достигая максимума при $T_{кр}$, ниже которой оно изменяется мало.

Следовательно, не только липид оказывает воздействие на конформацию мембранного белка, но и сами молекулы белка модифицируют бислой. Разные формы такой модификации представлены на рис. 20, где показана способность белковых молекул изменять структурную упаковку бислоя, его толщину и градиент гибкости.

1.2.4. Роль холестерина

Значение для состояния мембранной структуры холестерина и систем, регулирующих его уровень в организме, заслуживает особого внимания. Молекула холестерина легко встраивается в бислой, особенно в зоны дефектов бислоя (см. рис. 1). Специфика структуры холестерина обеспечивает возможность взаимодействия его гидроксильной группы с карбонильным кислородом ацильных цепей фосфолипидов, а также обширный гидрофобный контакт между самими жирнокислотными цепями и стероидным кольцом молекулы холестерина. Именно эта часть молекулы ответственна за структурирующий эффект стероида. Метиленовый хвост молекулы не оказывает существенного влияния на плотность упаковки бислоя (рис. 21).

Встраивание холестерина в фосфолипидный бислой вызывает как нарушение квазикристаллической упаковки жирнокислотных цепей при температуре ниже $T_{кр}$, так и уменьшение подвижности (возрастание упорядоченности) цепей при температуре выше $T_{кр}$. Эти эффекты холестерина называют соответственно «разжижающим» и «конденсирующим». Избыток холестерина увеличивает микровязкость бислоя и понижает скорость таких реакций, которые имеют диффузионно-зависимые лимитирующие стадии. Возрастание уровня холестерина в мембранах — характерная черта *наследственных гиперхолестеринемий, ишемической болезни сердца, атеросклероза*.

Выяснение «вредной» роли холестерина в развитии атеросклероза дало основание многим клиницистам рекомендовать исключение холестерина из диеты. Однако позже было показано существование в крови специальной системы обмена холестерина; оказалось, что в организме ежедневно образуется даже больше холестерина, чем поглощается его с пищей. Большая часть холестерина окисляется в печени до *желчных кислот*:

внедрению в мембрану (*липопротеины особо низкой плотности* — ЛПОНП).

В норме отношение атерогенных и антиатерогенных липопротеинов сбалансировано, и коэффициент атерогенности определяется, как (ЛПНП+ЛПОНП): (ЛПВП) (где ЛПНП — *липопротеины низкой плотности* — также принимают участие во внедрении холестерина в бислой). Для ряда животных характерно очень низкое значение этого коэффициента (например, у собаки, песка). У этих животных нельзя вызвать экспериментального атеросклероза даже при пищевой нагрузке холестерином. Другие животные легко подвергаются атерогенным изменениям при алиментарной (пищевой) гиперхолестеринемии. Так, у крыс при ежедневном потреблении 15 мг холестерина выраженный атеросклероз сосудов наблюдается уже через 1—3 недели.

Окисленный холестерин не в состоянии встраиваться в мембраны; не удерживаются в мембранном бислое и эфиры холестерина. Оба способа модификации молекулы холестерина, вероятно, используются клеточными мембранами для защиты от его избытка. Действительно, липопротеиновые комплексы, удаляющие холестерин из мембран, содержат фермент, этерифицирующий его молекулу — *лецитин-холестерин-ацилтрансферазу*. Образование эфира холестерина облегчает его высвобождение из бислоя (см. также VI.4.1).

В последнее время обнаружен эффективный способ снижения уровня мембранного холестерина — увеличение в пище количества фосфолипидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты (Арчаков и др., 1984). Так, введение в кровь животным мицеллярной формы фосфолипидов соевых бобов на фоне экспериментального атеросклероза снижает почти вдвое содержание холестерина в эритроцитарных мембранах и восстанавливает в них исходную активность транспортных ферментов. Одновременно снижаются *агрегация тромбоцитов и коэффициент атерогенности*, а микровязкость клеточных мембран восстанавливается почти до нормального уровня.

1.2.5. Белок-липидные взаимодействия

Глобулярные белки обладают повышенной лабильностью в водном окружении. По данным ЯМР-спектроскопии установлено, что вода увеличивает *свободный объем белковых глобул*, способствуя проявлению их внутренней конформационной подвижности. Иная ситуация возникает в случае гидрофобного белка в мембране. В то время как вращение метиленовых групп вокруг С—С-связей почти не требует *свободного гидрофобного объема*, он необходим для проявления конформационной лабильности мембранного белка.

Существуют косвенные указания на то, что внутренняя лабильность белков возрастает при образовании ассоциатов из нескольких молекул. Возможно, именно это свойство обуславливает тенден-

цию мембранных белков к *олигомеризации*. Образование олигомерных ассоциатов — не случайный результат «статистических взаимодействий», образуемые структуры «запрограммированы», соотношение субъединиц предопределено: в ряде случаев удается воспроизвести образование таких структур спонтанно при реконструкции предварительно солюбилизированных комплексов. Липиды, участвуя в организации мембранного бислоя, играют важную роль в поддержании нативной конформации мембранных ферментов, контролируют взаимоотношения между субъединицами внутри олигомерных комплексов.

Для чего нужна такая сложная надмолекулярная организация мембранных белков, что получают молекулы взамен утрачиваемой автономии? На эти вопросы не всегда может быть дан ясный и однозначный ответ. Проще объяснить феномен надмолекулярной организации мембранных систем, когда за счет межбелковых связей образуются цепи, соответствующие метаболическим, как в случае *гликолиза* или *дыхательной цепи*, или когда образуемые ассоциаты обладают каким-либо дополнительным свойством — более термостабильны, приобретают повышенную молекулярную активность и т. д.

В ряде случаев ясно, что ассоциация гидрофобных белков необходима для проявления функциональной активности, особенно когда фермент состоит из несимметричных и комплементарно соответствующих друг другу субъединиц. Такой случай называют гетерологической ассоциацией (в отличие от изологической ассоциации, при которой взаимодействуют симметричные протомеры, сохраняющие «эквивалентность»). Пример гетерологической ассоциации дает *гексокиназа*, катализирующая фосфорилирование глюкозы в присутствии $Mg\text{-}ATP$ (Гончарова, 1985). Гексокиназа существует в виде димера с молекулярной массой 102 кДа. Повышение рН или ионной силы вызывает диссоциацию димера, наличие обоих субстратов реакции — его ассоциацию. Субъединицы в ассоциате ориентированы несимметрично: два типа кристаллов, обнаруживаемых на рентгенограммах, соответствуют двум способам ассоциации. Для одного из способов, соответствующего наличию ферментативной активности, показано, что группы, участвующие в образовании белкового домена, принадлежат различным участкам каждого протомера. Это означает, что после связывания партнеров каждая молекула в ассоциате имеет разные группы в свободном состоянии.

В отсутствие нуклеотида глюкоза может связываться лишь с «нижней» глобулой димера, появление ATP делает субъединицы равноценными в отношении связывания. Димер более активен, чем мономер. Более того, на границе взаимодействия протомеров формируется центр для связывания дополнительной молекулы ATP , обеспечивающий аллостерическую регуляцию активности.

Асимметричны также и димеры *креатинкиназы* — фермента с молекулярной массой 82,6 кДа, обеспечивающего обратимый пе-

ренос «высокоэнергетического» фосфата с адениловой системы на креатин. Об их асимметрии свидетельствует различная реакция субъединиц на SH-реагенты.

Гибридные гетеродимеры образует и аргининкиназа, выполняющая аналогичную функцию в тканях беспозвоночных. Существует мнение, что направление катализируемой этими ферментами реакции (прямая или обратная креатинкиназная реакция) зависит от того, мономерной или димерной формой представлен фермент.

Дегидрогеназа 3-фосфоглицеринового альдегида дает пример изоляггической ассоциации. Ее олигомерные ансамбли составлены из эквивалентных протомеров, исходно обладающих ферментативной активностью. Сборка ассоциата выявляет *асимметрию субъединиц* и возможность кооперативной реакции на субстрат или регулятор.

Какую же функцию выполняет при этом липидное окружение? Интересным примером фермента, для которого существует простой и, по всей видимости, правильный ответ на поставленный вопрос, является *УДФ-глюкуронилтрансфераза*, обнаруживаемая в высокоактивной форме в микросомальных мембранах печени. Этот фермент играет ключевую роль в нейтрализации как экзогенных, так и эндогенных токсических веществ гидрофобной природы. Субстратом фермента являются спирты, фенолы, жирные кислоты, амины и другие соединения, загрязняющие внешнюю среду.

Сравнение свойств УДФ-глюкуронилтрансферазы, гидролизующей водорастворимые субстраты, с ее свойствами, когда в качестве субстратов выступают гидрофобные вещества, позволило сделать вывод, что при образовании ансамблей *УДФ-глюкуронилтрансферазы* в мембране возникают «*гидрофобные карманы*», способствующие концентрированию гидрофобных субстратов и ориентирующие их определенным образом относительно реактивных групп активного центра. Это приводит к уменьшению энтропийного фактора реакционного процесса. В данном случае липидная фаза является непосредственным участником ферментативного процесса.

Транспортные АТФазы, функция которых заключается в энергетическом обеспечении активного транспорта ионов, в нативной мембране также представлены *олигомерными конструкциями*. Это было достоверно показано с помощью метода радиоинактивации (метод молекулярной мишени). Принцип его заключается в определении кинетики инактивации фермента в нативной мембране после ее облучения потоком высокоэнергетических электронов. Используя эмпирическое уравнение зависимости скорости инактивации от дозы радиации (она пропорциональна размерам функциональной единицы фермента в мембране), можно найти эти размеры и соотнести их с молекулярной массой протомера. Для Na, K-АТФазы получено, что фермент в мембране представляет собой молекулярную мишень, по крайней мере вдвое превышающую размеры молекулы. Аналогичные результа-

ты получены для Са-насоса ретикулума и К, Н-АТФазы слизистой желудка.

Для объяснения биологической роли этих ассоциатов высказывалось предположение, что мономерные соответствующих ферментов неактивны и активируются при образовании олигомерных комплексов, но вскоре были получены солибилизованные в детергентах мономерные формы Na, К-АТФазы и Са-АТФазы, обладающие гидролитической активностью. Было показано также, что возрастание жидкостности бислоя, индуцируемое низкими концентрациями детергентов группы В (например, *дигитонин*, желчные кислоты), нарушает межбелковые взаимодействия, но не изменяет тип кинетического поведения ферментов этого класса. Однако в этих условиях нарушается кооперативная реакция на субстрат для Na, К-АТФазы. Для Са-АТФазы известно, что мономерная форма не реагирует на факторы, вызывающие разобщение гидролитического и транспортного процесса. В связи с этим возникает вопрос, на который пока что нет ответа: какое значение имеет олигомерная ассоциация ионных насосов для осуществления их транспортной функции?

Возможно, образование олигомерных конструкций ионных насосов повышает эффективность их функционирования, увеличивая количество транспортируемых ионов в расчете на 1 молекулу АТФ. Так, в лаборатории И. Скоу было показано, что Na, К-зависимая АТФаза, находясь в солибилизованной (мономерной) форме, связывает меньшее количество ионов K^+ (активный транспорт которых осуществляет), чем в несолиблизованном (димерном) состоянии.

Сопряжение гидролитической и транспортной реакций в процессе работы ионных насосов зависит от состояния мембраны. Так, на *стехиометрию транспорта* K^+ и Na^+ , Na,К-АТФазой влияет температура, причем в области температур ниже $T_{кр}$ для данного мембранного окружения наблюдается эффект разобщения гидролитической и транспортной реакций.

Графики Аррениуса для транспортных АТФаз нелинейны с переломом при температуре, соответствующей $T_{кр}$ для данного мембранного окружения. Следовательно, вид графика Аррениуса для мембранного фермента можно использовать при характеристике жидкостности этих мембран.

Изменение жидкостности мембраны контролирует взаимодействие между отдельными молекулами интегральных белков, что иллюстрирует рис. 22. В условиях, когда бислой находится при температуре выше $T_{кр}$ и *латеральная подвижность белков* ничем не ограничена, молекулы белка распределены в мембране случайным образом. Понижение температуры и разделение фаз, приводящие к образованию более упорядоченных участков бислоя, ограничивают подвижность белков, вытесняемых в области бислоя, оставляющие более жидкими: происходит «*вымораживание*» белков, увеличивающее вероятность их ассоциации. В присутствии холестерина белки занимают преимущественно области мембраны,

обедненные стероидом. Понижение температуры в этом случае также индуцирует агрегацию белков, но в условиях, значительно ограничивающих их подвижность.

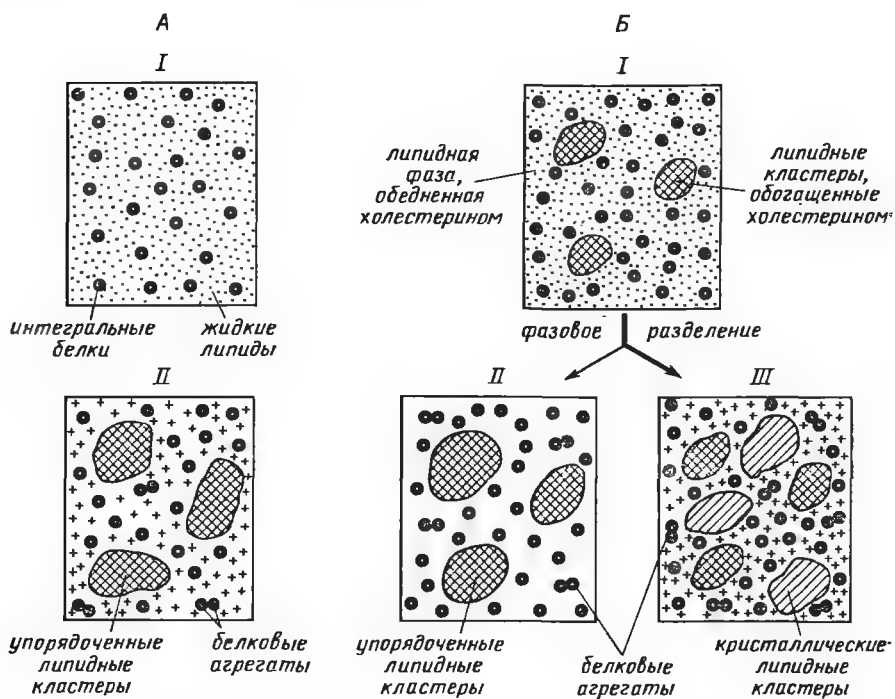


Рис. 22. Фазовое разделение в биомембранах: А — в лишенной холестерина мембране при температуре выше фазового перехода (I) интегральные белки диффузно распределены в жидком бислое, при понижении температуры ниже фазового перехода (II) образуются кластеры легко кристаллизующихся липидов; белки «вымораживаются» в более жидкую область. Б — в мембранах, обогащенных холестерином, белки занимают преимущественно области, свободные от холестерина (I). Понижение температуры также вызывает разделение фаз, приводящее к еще более выраженному «вымораживанию» белковых молекул и их агрегации. Холестерин или остается в составе кластеров более упорядоченных липидов (II) или (при образовании кристаллических областей из липидов, образующих твердую фазу (III) при высокой температуре) модифицирует весь липидный бислой

Температурная чувствительность мембранных ферментов, обеспечиваемая специальными свойствами мембранных липидов, по-видимому, гораздо глубже проявляется в регуляции метаболизма, чем полагали ранее. Так, для ряда биологических объектов обнаружены такие критические температурные точки, от которых зависит не только поведение, но и внешний вид объекта. Раковина корненожки *Neogloboquadrina pachyderma* вырастает закрученной «по» или «против» часовой стрелки в зависимости от того,

при какой температуре растет животное — ниже или выше $T_{кр}$ (в этом случае $T_{кр}$ составляет 7°C).

Недавно учеными обнаружен феномен, названный «молекулярной памятью липидов». Суть его заключается в том, что многие краткосрочные события, протекающие в мембранном бислое, влияют на долговременные параметры его функционирования. При воздействии соответствующего лиганда на мембранный белок-рецептор конформация последнего изменяется, что индуцирует изменение как белок-липидных контактов, так и состояния липидов, окружающих белок. Это изменение состояния липидов сохраняется и после отщепления лиганда от рецептора, т. е. служит способом закрепления рецептора в «возбужденной» конформации. Таким образом, «память» липидов обеспечивает *усиление сигнала*, передаваемого из внешней среды на клеточную мембрану.

Это — неизвестный ранее механизм усиления, не похожий на те механизмы, в основе которых лежат *ферментные каскады* (например, аденилатциклазная система). Этот механизм также требует «внешней» энергии — от нее зависит длительность возбужденного состояния мембранного рецептора. По мнению Л. Д. Бергельсона, таким источником энергии в данном случае является *фазовое разделение липидов* в мембранном бислое. С помощью флуоресцентных аналогов глико- и фосфолипидов показано, что бислой способен воспринимать и сохранять в памяти информацию об изменении состояния мембранных белков. Этим можно объяснить сверхвысокую чувствительность биологических структур к простагландинам и другим биологически активным соединениям, при которой одна молекула лиганда при взаимодействии с мембранным рецептором может полностью перестроить характер клеточного метаболизма.

Белковый, липидный и углеводный состав клеточных мембран находится в состоянии динамического равновесия в течение всей жизни клетки. Это равновесие является ранним завоеванием эволюции. Основной план химического строения мембран сформировался давно — у разных видов, не объединенных ни генетической, ни экологической общностью, встречаются одни и те же фосфолипиды в близких соотношениях (Крепс, 1981). Видимо, этот набор фосфолипидов обеспечил мембранным структурам какие-то преимущества. Такими преимуществами могут быть *термодинамическая стабильность, динамическая подвижность*, сочетание легкости обмена компонентами со средой и определенной *устойчивости структуры*, избирательность реакции. Однако вопрос о том, каким образом набор фосфолипидов обуславливает те, а не иные свойства мембраны, не имеет однозначного ответа.

В процессе онтогенетического созревания тканей выявляются определенные закономерности в изменении липидного состава клеточных мембран; ниже отмечены основные. В ходе онтогенеза повышается содержание фосфатидилэтаноламина по отношению к фосфатидилхолину и увеличивается количество сфингомиелина. Критерием определенного «совершенства» мембран является заме-

на диацильной формы фосфолипидов на плазмалогенную, а также нервноюой кислоты сфингомиелина на стеариновую (последний процесс связан с появлением серого вещества головного мозга). В онтогенезе происходит также увеличение микровязкости мембран за счет уменьшения количества ненасыщенных жирных кислот (снижение индекса ненасыщенности).

Однако *индекс ненасыщенности*, так же как и ряд других факторов, регулирующих жидкость мембран (положение двойных связей, содержание жирных кислот с нечетным количеством углеродных атомов), весьма variabelен. Изменения этих величин отражают разнообразные механизмы приспособления мембран к изменяющимся условиям среды. Генетически закрепленные *адаптации*, сезонные *акклиматизации* или *акклимация* в экспериментальных условиях осуществляются в ограниченные временные сроки в ответ на дозированные изменения каких-либо факторов среды; главный механизм для всех них — изменение жирнокислотного состава мембранных липидов. Это положение позволило Е. М. Крепсу выдвинуть концепцию о том, что биологические мембраны являются мишенью для адаптации организма, структурами, которые в первую очередь отвечают приспособительной реакцией на изменения внешней среды.

Приспособительная реакция организма отчетливо прослеживается в процессе подготовки зимнеящих животных к *гибернации*. Известно, что у таких животных в период спячки температура тела снижается до 5°C. Мембранные ферменты бодрствующих животных уже не в состоянии функционировать при этой температуре, поскольку она гораздо ниже $T_{кр}$, а в области температур ниже фазового перехода мембраны слишком упорядочены, чтобы обеспечить конформационную лабильность белка. Однако подготовка организма к зимнему сезону включает изменение фосфолипидного состава мембран и увеличение в их составе доли полиненасыщенных жирных кислот. В результате активность мембранных ферментов таких животных оказывается на достаточно высоком уровне даже при понижении температуры до 2°C.

Особенности динамического поведения мембранных структур, обнаруженные в последнее десятилетие, существенно обогатили первоначальную концепцию строения мембраны, предложенную в 1972 г. Сингером и Никольсеном. Ныне эта концепция обогатилась представлениями о высокой динамической подвижности белок-липидных и белок-белковых взаимодействий в мембране. Эту подвижность стали рассматривать как специфический *сенсор* изменений внешней (для клетки) среды и одновременно как *инструмент регуляции* мембранных процессов.

В настоящее время для характеристики функционирования ансамбля дыхательных ферментов в митохондриях, принципов регуляции аденилатциклазной реакции, в ходе которой в бислое образуются тройной комплекс гормон — рецептор — фермент, и дру-

гих аналогичных реакций привлекается представление о динамическом ансамбле с ограниченным временем жизни.

Обращают внимание на то, что многие ферменты, ранее представляющиеся цитоплазматическими, также способны создавать структурно-функциональные ансамбли, соответствующие их метаболической активности. Такие агрегаты, названные *метаболами*, часто оказываются связанными с наружной или внутренней клеточной мембраной. В основе такого связывания лежат слабые взаимодействия. Отсюда легко предположить, что в клетке осуществляется динамическое равновесие: организованный (мембраносвязанный) белковый комплекс ↔ набор невзаимодействующих индивидуальных белков. Время жизни и условия образования такого комплекса диктуются потребностями клеточного метаболизма.

Очевидно, существуют механизмы, стабилизирующие ферментные ансамбли в мембране. Наличие таких ансамблей создает преимущества для функционирования мультиферментных комплексов — «эффект конвейера». С другой стороны, динамический принцип организации многоферментных систем увеличивает надежность этих систем и облегчает встраивание в мембрану вновь синтезируемых компонентов.

Однако более существенно, что динамическая неоднородность в распределении белков и способность их к образованию короткоживущих ассоциатов являются основой особого уровня регуляции клеточного метаболизма — *топодинамической регуляции* (Капельянец, 1988).

В отличие от тех уровней регуляции, которые включают процессы транскрипции и трансляции, аллостерические эффекты, участие вторичных мессенджеров, химическую модификацию ферментов и осуществление которых инвариантно относительно пространственных координат, топодинамическая регуляция осуществляется на основе изменения пространственного расположения белков в клетке. Например, латеральное светозависимое перемещение светособирающего комплекса в мембране хлоропластов обеспечивает перераспределение энергии между двумя фотосистемами. Редокс-зависимое связывание *пролиндегидрогеназы* с мембраной *E. coli*, как полагают, регулирует функционирование электрон-транспортной цепи.

За счет каких механизмов может происходить изменение взаиморасположения белков и ферментов в клетке? Связывание гликолитических ферментов на элементах цитоскелета контролируется сборкой элементов матрикса. Специфические субстраты также могут изменять степень связывания растворимых ферментов с мембраной. Если учесть, что одновременно в клетке функционирует множество ферментов (элементов), то в результате «интерференции» распространяющихся возмущений мы будем иметь сложную результирующую картину распределения элементов, быстро меняющуюся во времени. В зависимости от того, насколько подвижна активная среда, на элементах которой производится своеобразная запись и запоминание метаболической ситуации в

клетке, настолько продолжительным во времени будет данный «метаболический рисунок».

Поскольку скорости латеральной диффузии белков в биомембранах значительно ниже скорости их диффузии в цитозоле (а следовательно, и время удержания белковых ансамблей в мембране продолжительнее, чем в цитозоле), пространственно-временное распределение ферментов в мембране может «контролировать» состояние ферментов цитозоля. И в этом смысле мембранные структуры интегрируют клеточный метаболизм. Подчеркнем, что такое метастабильное состояние возможно лишь в живой, метаболизирующей клетке.

Способность белков к изменению взаимной топографии делает важным то, в каком участке клетки (субклеточной структуры) локализован фермент и какой сосед находится рядом: функционально значимый или «посторонний», и какова локальная концентрация данного соседа? Иначе говоря, для полного описания клеточного метаболизма (или хотя бы его звена) мы должны наряду с активностью фермента вводить его пространственные координаты, которые являются функцией времени. Смысл же топодинамической регуляции состоит в образовании «метаболического рисунка», или мозаики в клетке, с помощью которого регулировалась бы пространственная «напряженность» данного метаболического звена (количество продукта, образуемого в единицу времени в данной точке пространства) а следовательно, и локальная концентрация метаболитов.

ВОПРОСЫ

1. Назовите виды подвижности липидов и белков в биомембранах и укажите сравнительные скорости этих процессов.
2. Что такое фазовое состояние липидов и фазовые переходы, как влияют белки и другие компоненты мембран на эти процессы, какими способами можно измерить фазовые переходы или установить критическую температуру?
3. Способы создания и поддержания асимметрии биологических мембран.
4. Что такое аннулярные липиды?
5. Сформулируйте принцип топодинамической регуляции клеточного метаболизма.

1.3. ЦИТОСКЕЛЕТ ЖИВОТНОЙ КЛЕТКИ

К внутренней стороне клеточной мембраны, обращенной в цитоплазму, примыкают специальным образом организованные структурные белки, составляющие *цитоскелет* животной клетки. Структура цитоскелета довольно лабильна, его перестройки проходят постоянно и с большой скоростью. Получение фрагментов цитоскелета в изолированном состоянии, их идентификация и реконструкция позволили установить тонкую структуру цитоскеле-

та. Методически легче всего проделать эту работу на эритроцитах. На рис. 23 изображена ориентация белков цитоскелета эритроцитов, а также относительное расположение индивидуальных белков этой структуры при электрофорезе и их цифровое обозначение. В состав цитоскелета входят 12 различных белков с молекулярной массой от 25 до 250 кД.

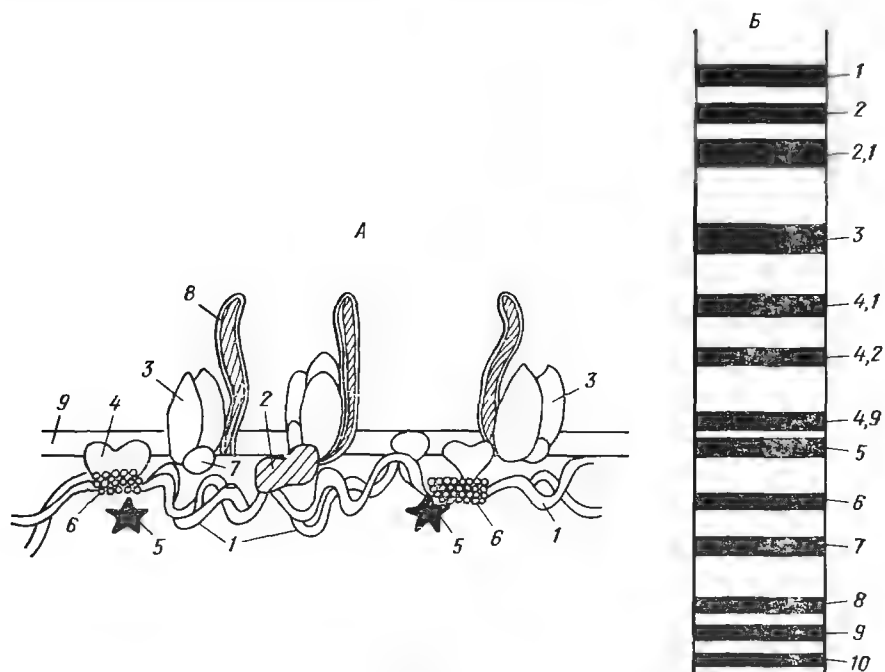


Рис. 23. Цитоскелет клетки (по Гончаровой и Пинаеву, 1988). А — схема расположения белков в цитоскелете эритроцитов: 1 — спектрин; 2 — анкерин; 3 — белок полосы 3; 4 — белок полосы 4,1; 5 — белок полосы 4,9; 6 — олигомер актина; 7 — белок полосы 6; 8 — гликофорин; 9 — мембрана. Б — электрофо- реграмма белков цитоскелета: 1,2 — спектрины; 2,1 — анкерин; 5 — актин; 6 — неидентифицированный белок; 7 — тропомиозин; 8 — гликофорин А; 9 — гликофорин В; 10 — гликофорин С; остальные белки обозначены цифрами, соот- ветствующими их положению на электрофо- реграмме

Функции ряда белков установлены. Наибольшая фракция — полоса 3 — представлена интегральным белком гликопротеином с молекулярной массой 90 кДа, который взаимодействует с мембраной и одновременно обеспечивает транспорт ионов через бислой, а также связывание ряда цитоплазматических ферментов. Белок полосы 3 через анкерин (полоса 2,1) взаимодействует со спектрином — основным белком цитоскелета, составляющим двумерную сеть, к которой прикрепляется актин. При электрофорезе актин выявляется в полосе 5. Белки полос 8, 9 и 10 относятся к семейству гликофоринов (см. рис. 23).

Сеть спектрина расположена на некотором расстоянии от мембраны, но с ней связана. Латеральная подвижность интегральных белков мембраны зависит от присутствия спектрина. При обработке тканей химо tripsином был выделен белок с массой 72 кДа, который ингибировал взаимодействие спектрина с обединенной этим белком мембраной. С помощью моноклональных антител показано, что 72 кДа белок принадлежит полосе 2,1; его назвали *анкеррином*.

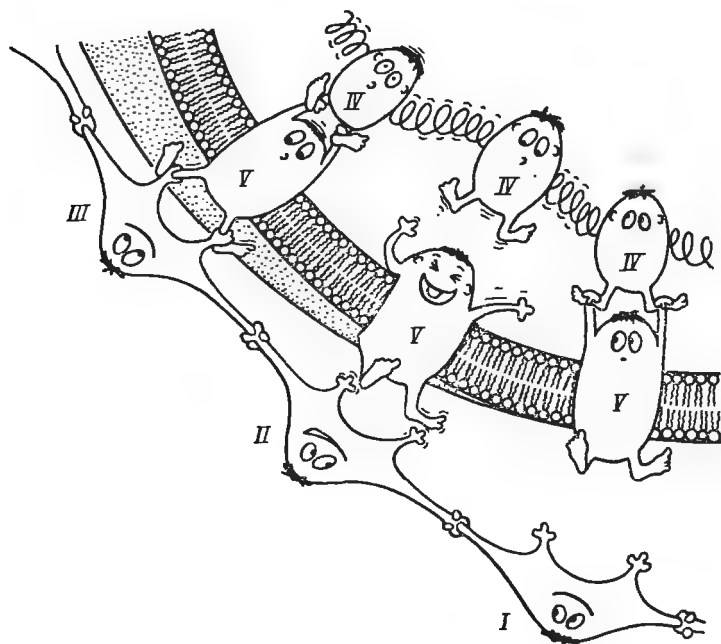


Рис. 24. Взаимодействие цитоскелета с гликокаликсом: I — протеогликан, II — коллаген, III — фибронектин; образуют плотную сеть, IV — молекулы актина, V — интегральные белки мембраны типа белка полосы 3

Актин цитоскелета не существует в виде отдельных глобул, а образует *микрофиламенты*, в состав которых входит и ряд минорных белков — *тропомиозин*, *миозин*, белки полос 4,9 и 4,1, регулирующие полимеризацию актина. Микрофиламенты представляют собой сократительный аппарат цитоскелета. Эта система также находится в динамическом состоянии в силу способности актина к обратимой ассоциации — диссоциации под влиянием различных факторов.

К цитоскелету примыкают *микротрубочки*, образуемые при полимеризации двухцепочечного глобулярного белка тубулина с общей массой 55 кДа. Самосборка трубочек происходит при гидролизе ГТФ. Каждый виток спирали, образующей микротрубочку, со-

стоит из 13 молекул тубулина. Фосфорилирование тубулина специфическими протеинкиназами ускоряет образование трубочек, а Ca^{2+} вызывает их диссоциацию.

Основная роль микротрубочек заключается, по-видимому, в обеспечении приемлемого транспорта веществ, секрции, эндоцитозе и т. д.

Соотношение белка полосы 3 и анкерина в нативном эритроците составляет 10:1, а связываться они могут эквимоларно, т. е. места прикрепления цитоскелета к мембране клетки не являются постоянными, а могут изменяться.

Благодаря динамическим свойствам цитоскелета изменения в его структуре позволяют клетке проявить гибко-эластичные свойства, изменять свою форму. В той области клетки, где спектриновая сеть разрушается, могут образовываться впячивания или возникать отшнуровывающиеся части клетки. С другой стороны, наличие цитоскелета обеспечивает дополнительную прочность мембране. Белки, отвечающие за взаимодействие цитоскелета с мембраной, носят название амфитропных (см. I.1.2).

Внеклеточный матрикс, состоящий из гликопротеинов, протеогликанов и глюкозаминогликанов, связывается с мембранными структурами с помощью специальных белков-рецепторов, объединяющих через амфитропные белки цитоскелет, мембрану и внеклеточный матрикс в динамическую, подвижную структуру (рис. 24). Биологический смысл такого объединения заключается, видимо, в том, чтобы облегчать передачу механического сигнала как вдоль по мембране, так и в поперечном направлении. Наличие такого насыщенного углеводными компонентами внеклеточного слоя (его называют также *гликокаликсом*) играет важную роль в проявлении адгезивных свойств клетки, ее иммунных реакций и т. д.

ВОПРОСЫ

1. Из чего состоит цитоскелет животной клетки?
2. В чем заключается роль микрофиламентов и микротрубочек?
3. Роль амфитропных белков в поддержании динамического состояния цитоскелета.
4. Из чего состоит внеклеточный матрикс?
5. Что такое гликокаликс?

I.4. ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ МЕМБРАН РАСТИТЕЛЬНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Клеточная стенка растительных клеток содержит большие количества *целлюлозы* — наиболее распространенного вещества в природе. Основу ее составляет дисахарид *целлобиоза*, представляющий собой две молекулы глюкозы, соединенные $\beta(1\rightarrow4)$ -связями. В отличие от $\alpha(1\rightarrow4)$ -связей в *крахмале* и *гликогене* β -связь гидролизруется только в концентрированных щелочах.

Целлюлоза придает жесткость мембранным структурам растительных клеток, которые, как правило, должны выдерживать значительные гравитационные нагрузки.

В составе клеточной стенки растений находят также разнообразные гетерополисахариды, обладающие антигенной специфичностью.

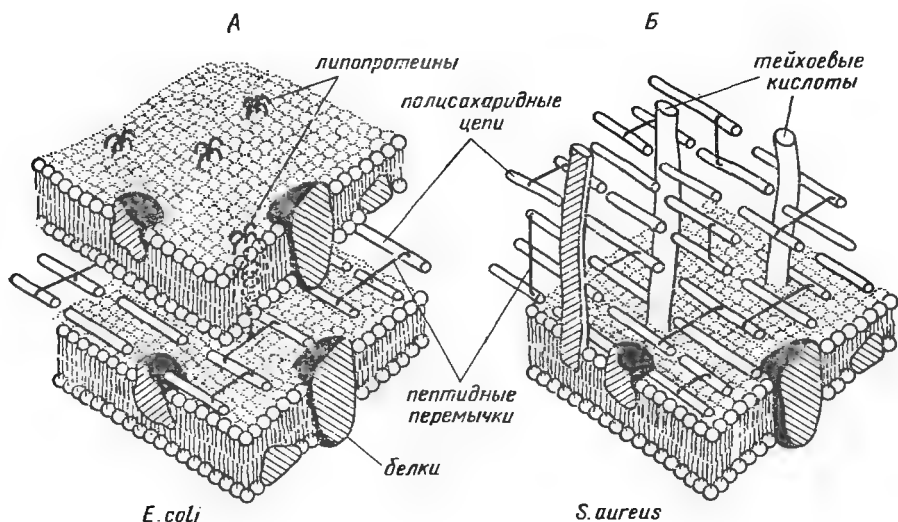


Рис. 25. Схема строения бактериальной стенки грамотрицательных (А) и грамположительных (Б) бактерий

Большинство микроорганизмов почти весь период своей жизнедеятельности проводят как одноклеточные организмы. Их хрупкая цитоплазматическая мембрана окружена наружной клеточной стенкой, защищающей клетку от внешней среды (рис. 25). Между мембраной и клеточной стенкой находится периплазматическое пространство, содержащее растворимые белки и другие компоненты.

В соответствии с реакцией на йодный раствор сафранина бактерии делят на *грамположительные* и *грамотрицательные*. Состав их клеточных стенок различен. У первых над периплазмой обнаруживается слой *пептидогликана* и над ним *тейхоевые кислоты* — полимеры из остатков *глицерина* и *рибита*, соединенный фосфоэфирными мостиками. Тейхоевые кислоты составляют более половины массы клеточной стенки *золотистого стафилококка* и *молочнокислых бактерий*. Именно тейхоевые кислоты обеспечивают антигенные свойства при попадании бактерий в организм позвоночных. Они же обеспечивают высокие адгезивные свойства бактериальных клеток.

Действие антибиотика *пенициллина* на грамположительные бактерии объясняется ингибированием синтеза клеточной стенки, поэтому для клеток животных он безвреден.

Над тонким слоем пептидогликана клеточной стенки грамотрицательных бактерий находится многокомпонентный слой липополисахаридов, включающих *гексозамины*, *гексозы*, *пентозы*, *3,6-дезоксигексозы* и т. д., обеспечивающих многообразие серологических реакций. Только у сальмонеллы можно серологически установить до 700 видов антигенных детерминантов. Пенициллин не действует на жизнедеятельность таких бактерий; эффективно их подавляют *стрептомицин* и родственные ему антибиотики.

Характерно, что два типа бактерий различаются между собой не только строением клеточной стенки, но и составом плазматической мембраны: грамположительные бактерии (*Bacillus megaterium*) содержат из всех липидов преимущественно *фосфатидилхолин*, а грамотрицательные (*E. coli*) — лишь *фосфатидилэтаноламин*.

В состав клеточной стенки всех бактерий входят также слизистые и адгезивные соединения. Клеточная стенка предотвращает проникновение из внешней среды к мембране вредных гидрофобных веществ.

ВОПРОСЫ

1. Что такое клеточная стенка растительной клетки?
2. На чем основано деление бактерий на грамположительные и грамотрицательные?
3. Избирательность действия антибиотиков.
4. Чем обусловлена адгезивность бактериальной мембраны?
5. Какие соединения обеспечивают антигенные свойства бактерий?

15. ИСКУССТВЕННЫЕ МЕМБРАНЫ И ПРОТЕОЛИПОСОМЫ

Искусственные мембраны получают из полярных липидов различными способами. Мономолекулярную мембрану можно получить, помещая на границе фаз вода — воздух каплю липида в летучем растворителе; после испарения растворителя образуется мономолекулярный слой, в котором гидрофильные «головы» фосфолипидов ориентированы в водную часть, а гидрофобные концы — в воздух.

Бислойная искусственная мембрана может быть получена нанесением капельки липида в растворителе (например, гептане) на отверстие (как правило, диаметром 0,1—1 мм) в тефлоновом стаканчике. После чего этот стакан помещается в стакан большего объема, и оба сосуда заполняют растворами, которые могут имитировать внутриклеточную жидкость. Подобные мембра-

ны удобно использовать для исследования электрических параметров липидных бислоев.

Для решения исследовательских задач, связанных в первую очередь с реконструкцией биологических мембран, используются *липосомы*. Липосомы образуются при помещении полярных липидов в водную фазу. В этих условиях они спонтанно образуют двойной слой общей толщиной около 80 Å. Бислоем замыкается в везикулы, не проницаемые для ионов.

Размеры липосом зависят от метода получения. Мультиламеллярные липосомы представляют собой везикулы диаметром 0,1—5 мкм; маленькие однослойные — 0,02—0,05 (200—500 Å); большие однослойные — 0,06 мкм и больше.

Получение мультиламеллярных липосом

Тонкую пленку фосфолипидов после выпаривания органического раствора помещают в водную фазу и встряхивают рукой до растворения. Можно добавлять промытый песок или стеклянные бусинки для ускорения растворения при встряхивании или использовать смеситель «Vortex». Смесь мутная и должна «созреть» несколько часов до использования. Для предотвращения перекисного окисления липидов следует применять атмосферу N_2 или антиоксиданты. Если для образования липосом используется смесь разных фосфолипидов, они должны быть хорошо перемешаны в органическом растворе перед использованием. Затем суспензию пропускают через колонку с сефадексом для отделения липосом от незахваченного материала. Все операции проводят при температуре выше $T_{кр}$ для самого «тугоплавкого» компонента.

Образование маленьких однослойных липосом

Обработка мультиламеллярных липосом ультразвуком приводит к образованию маленьких однослойных липосом размером 200—500 Å. Эту операцию проводят в атмосфере инертного газа (азот или аргон). В ходе ее можно одновременно заменить или насытить содержимое липосом I типа нужными компонентами. Температура при ультразвуковой обработке должна быть максимально низкой, но все же выше, чем $T_{кр}$ для используемых липидов.

Другой метод получения маленьких однослойных липосом — впрыскивание спиртового раствора фосфолипидов шприцем в быстро перемешиваемый буферный раствор нужного состава. Однако он не гарантирует получение липосом одного (или близкого) размера.

В 1972—1975 гг. Э. Рэкер разработал простой, воспроизводимый и обеспечивающий получение липосом одного размера (или мало отличающихся друг от друга) метод, примененный им для реконструкции мембранных ферментов. Принцип метода заключается в использовании детергентного раствора фосфолипидов, из которого детергенты удаляются диализом. Недостатки метода: неполное удаление детергента и длительность приготовления. Положительным качеством метода является высокая гомогенность липосом (обычно от 60 до 180 Å) и возможность управлять их

размерами за счет изменения молярного соотношения фосфолипид:детергент (обычно используют холат Na); при увеличении этого отношения размер получаемых липосом возрастает. При пониженном соотношении фосфолипид:детергент и возрастании концентрации компонентов смеси размер липосом снижается. Недостатками метода являются неполное удаление детергента и длительность диализа.

Большие однослойные липосомы

Для приготовления однослойных липосом большого размера разработано несколько методов. Распространен метод быстрого впрыскивания эфирного раствора фосфолипидов в водную фазу при 30°C под пониженным давлением. После окончания процедуры растворитель удаляется выпариванием на вакуумном испарителе. После фильтрования оставшейся смеси через миллипоровый фильтр получают липосомы диаметром 1500—2000 Å.

Для очистки липидов, используемых в этих экспериментах, применяют стандартные процедуры.

Приготовленные по той или иной методике липосомы необходимо стандартизировать перед опытом, оценив их *размеры, структуру, гомогенность, ламеллярность, стабильность* и т. д.

Свойства липосом зависят не только от их размеров и строения, но и от типа липидов, входящих в их состав. При повышении в составе липосом доли отрицательно заряженных липидов — *кардиолипина* и *фосфатидилсерина* — мембрана приобретает отрицательный заряд, вследствие этого липосомы обладают плохой анионной проницаемостью.

В зависимости от доли холестерина и ненасыщенных липидов, формирующих везикулы, различают «твердые» и «жидкие» липосомы. Твердые липосомы, по-видимому, не способны взаимодействовать с клеточной мембраной.

В медицине и биотехнологии липосомы используются для доставки в клетку лекарств и химических соединений, стабилизации ферментов и т. д. Липосомы взаимодействуют с клеткой различным образом. Взаимодействие начинается с их *адсорбции* на поверхности клетки. После адсорбции липосомы могут обмениваться липидами с клеточной мембраной и сливаться с ней. Если содержимое липосомы способно проникать через клеточную мембрану, то, вытекая из липосомы, герметичность которой нарушается после адсорбции, вещество самостоятельно проникает в клетку. Липосомы могут быть поглощены клеткой в результате *эндоцитоза*. Процесс эндоцитоза липосом может быть направленно ускорен при включении в их состав детерминант, реагирующих со специфическими рецепторами плазматической мембраны клетки-мишени, отвечающими за регуляцию эндоцитоза.

В результате эндоцитоза липосомы попадают в лизосомы клеток. Разрушение липосом в лизосомах и высвобождение из них содержимого может быть ускорено, если липосомы приготовить из полярных соединений, свойства которых образуют замкнутые везикулы теряются при кислых значениях pH.

Предполагается, что после разрушения в лизосомах, липидные компоненты липосом включаются в клеточные мембраны, а гидрофильные компоненты, избежавшие деградации в лизосомах, попадают в цитоплазму. При обмене липидами (в этом процессе могут участвовать специфические ферменты) в липосому переходит часть липидов из клеточной мембраны, а часть ее липидов отдается клетке. Если липосома сливается с клеткой, ее мембраны соединяются с клеточной, а содержимое становится частью цитоплазмы клетки.

ВОПРОСЫ

1. *Принципы получения липосом.*
2. *Зависимость свойств липосом от свойств образующих их липидов.*
3. *Примеры применения липосом в медицине и биотехнологии.*

Глава II. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ БИОМЕМБРАН

II.1. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАННЫХ ФРАКЦИЙ

Клеточные мембраны даже в клетках одного типа значительно отличаются друг от друга как по составу, так и по осуществляемым ими функциям. По этой причине первоочередной задачей исследования обычно является получение клеточных фракций в достаточно чистом виде.

В неспециализированной клетке обнаруживаются следующие органеллы: ядро, окруженное двойной мембраной и содержащее плотно упакованную ДНК, митохондрии, эндоплазматический ретикулум, представляющий собой сеть трубочек и цистерн; аппарат Гольджи; лизосомы, пероксисомы (см. табл. 11). Плазматическая мембрана клетки является границей между содержимым клетки (цитоплазмой) и окружающей средой. Специализация клеток сопровождается потерей одних органелл и видоизменением других. Например, зрелые эритроциты человека лишены ядер, эндоплазматического ретикулума, митохондрий. В клетках мышечной ткани плазматическая мембрана образует впячивания, простирающиеся в глубь клеток (*T*-система); в секреторных клетках хорошо развит шероховатый эндоплазматический ретикулум, в рибосомах которого идет синтез секретируемых белков и т. д.

Для получения мембран клетки сначала разрушают, используя один из следующих методов: *осмотический шок*, *растирание* кусочков ткани с кварцевым песком или стеклянными шариками, *размельчение* гомогенизаторами различных типов. Метод разрушения клеток и длительность обработки выбирают в зависимости от типа ткани. Бактериальные протопласты и эритроциты обычно подвергают осмотическому шоку. Мягкие ткани (печень, мозг) разрушают с помощью *гомогенизатора Поттера*, более плотные (сердце, скелетные мышцы) — *ножевым гомогенизатором*, жабры рыб растирают с кварцевым песком.

Если полученную путем гомогенизирования смесь органелл и мембранных фрагментов подвергнуть центрифугированию, то частицы, имеющие различную плотность и размеры, будут оседать с разной скоростью. При постоянном центробежном ускорении скорость осаждения будет прямо пропорциональна массе частиц и разности между их плотностью и плотностью среды.

Разрушенные клеточные мембраны способны замыкаться и образовывать пузырьки диаметром 0,3—3,0 мкм. Смесь везикул, образованных из мембран различной природы, но имеющих примерно одинаковую плотность, называется фракцией *микросом*. В табл. 11 приведены данные о размерах и плотности различных органелл и получаемых из них фрагментов.

Клеточные компоненты печени крыс

Фракция	Диаметр частиц, мм	Режим осаждения		Равновесная плотность, г/см ³
		ускорение, g	время, мин	
Целые клетки	15—20	600	15	1,20
Ядра	3—12	600	15	1,32
Аппарат Гольджи				
крупные фрагменты	1—3	2 000	20	1,12—1,16
везикулы	0,05—0,5	145 000	15	1,06—1,14
Митохондрии	0,7—1,1	10 000	25	1,17—1,21
Лизосомы	0,4—0,8	10 000	25	1,12—1,16
Шероховатые микросомы	0,05—0,2	145 000	25	1,13—1,25
Гладкие микросомы	0,05—0,3	145 000	25	1,06—1,23
Плазматические мембраны				
крупные фрагменты	3—20	1 500	15	1,15—1,19
везикулы	0,05—0,3	145 000	30	1,07—1,19

Из табл. 11 видно, что если гомогенат какой-либо ткани центрифугировать с небольшим ускорением (например, в режиме 600 g, 15 мин), то осадят только ядра и неразрушенные клетки, при больших ускорениях (10 000 g, 15 мин) можно осадить фракцию, содержащую преимущественно митохондрии, а затем смешанную микросомальную фракцию. После центрифугирования в режиме 100 000 g, 1 ч в супернатанте остаются только растворимые белки (фракция цитозоля); все мембранные фрагменты выпадают в осадок. Метод избирательного осаждения клеточных фрагментов называют методом дифференциального центрифугирования, а получаемые с его помощью препараты — *субклеточными фракциями*.

Фракции, полученные при однократном центрифугировании, никогда не бывают чистыми. Так, митохондриальная фракция кроме митохондрий и их фрагментов будет содержать в различных количествах лизосомы, везикулы, образованные из плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума. Для лучшего разделения процедуру повторяют несколько раз; в некоторых случаях для удаления примесей (например, сократительных белков при выделении субклеточных фракций из мышечной ткани) мембранные фрагменты обрабатывают растворами высокой ионной силы.

Результаты фракционирования зависят от способа разрушения, состава среды и типа клеток, так как эти факторы определяют характер разрыва мембран и, следовательно, размеры образующихся фрагментов. Так, при непродолжительной гомогенизации из плазматических мембран получают довольно крупные фрагменты, осаждающиеся вместе с ядерной фракцией. В этом случае микросомальная фракция содержит небольшое количество везикул, образованных из клеточной мембраны. Если при гомогенизации получают мелкие пузырьки, то отделить фрагменты наружной

мембраны от фрагментов эндоплазматического ретикулума практически невозможно.

Грубые субклеточные фракции можно разделить на более чистые, состоящие преимущественно из мембран одного типа. Для этого проводят центрифугирование грубых фракций в градиенте плотности сахарозы или фикола.

Существуют два варианта этого метода. В первом проводят зонально-скоростное центрифугирование, при этом используют градиент с небольшим диапазоном концентраций. Его функция состоит главным образом в предотвращении перемешивания фракций при центрифугировании вследствие конвекции. Нанесенный на градиентный раствор гомогенат или грубую фракцию мембран центрифугируют непродолжительное время. Частицы распределяются в соответствии со скоростями их седиментации. При достаточно большом времени центрифугирования все фракции поочередно осаждаются на дно пробирки.

Во втором варианте проводят равновесное, или изопикническое, центрифугирование, при этом используют градиент, охватывающий весь диапазон плотности разделяемых частиц. На дно помещают раствор с плотностью, превышающей плотность самого тяжелого компонента смеси. Центрифугирование проводят до тех пор, пока все частицы не разделятся по зонам, соответствующим их собственной плотности.

После выделения субклеточных фракций необходимо их идентифицировать и проверить степень загрязненности другими оргanelлами. Для этого применяют несколько методов.

Микроскопия. Этот метод используют в первую очередь для идентификации ядерной фракции (фазово-контрастный микроскоп). Митохондриальные фрагменты или везикулы шероховатого эндоплазматического ретикулума, содержащие на своей поверхности рибосомы, также легко распознаются морфологически. Если диаметр везикул, образованных из наружных мембран клетки, достаточно велик (~ 4 мкм), их также можно отличить от более мелких везикул, образованных из внутриклеточных мембран. Если же диаметр этих пузырьков меньше 2 мкм, то морфологически идентифицировать плазматическую мембрану невозможно. С помощью микроскопии можно установить присутствие в препарате и других структур (незамкнутых обрывков мембран, фибрилл и т. п.).

Определение липидного состава. Все клеточные мембраны содержат липиды, однако соотношение липид:белок и набор липидов, как указывалось выше, часто бывают специфичны для данного типа мембраны. По этой причине определение липидного состава выделяемой фракции — необходимый этап ее характеристики.

Определение белкового состава. В большинстве случаев выделяемые мембранные фракции содержат большой набор белков с различной молекулярной массой. Тем не менее определение белкового состава с использованием электрофореза в полиакриламидном геле (в присутствии додецилсульфата натрия) может оказать-

ся полезным для идентификации мембран или определения их чистоты. Для некоторых типов мембран характерно присутствие значительных количеств белков с определенной молекулярной массой. Так, Са-АТФаза *саркоплазматического ретикулума*, обладающая молекулярной массой 100 кД, составляет 50—70% от общего количества белка микросом мышечной ткани, для плазматических мембран характерно присутствие значительных количеств гликопротеинов, которые можно выявлять специальным окрашиванием.

Определение активности маркерных ферментов. Фермент может служить *маркером* определенного типа мембран, если он прочно связан с мембраной, не инактивируется при выделении данной фракции и локализуется исключительно в данных органеллах. Хотя не все эти требования выполняются для большинства маркерных ферментов, изучение их поведения в процессе получения конкретной фракции позволяет довольно точно установить принадлежность выделенных мембран.

К сожалению, многие маркерные ферменты (например, Na, К-АТФаза, 5'-нуклеотидаза, *сукцинатдегидрогеназа*) при выделении или хранении могут терять активность. Кроме того, большинство встроенных в мембрану ферментов характеризуется асимметричной локализацией активного центра. По этой причине их активность в замкнутых фрагментах не удается определить из-за недоступности для субстрата. Это так называемая латентная активность фермента. Она может быть выявлена в присутствии низких концентраций детергента или ионофоров (типа аламетина), образующих крупные каналы в замкнутых мембранных везикулах.

Различные ткани содержат различные количества маркерного фермента. Например, глюкозофосфатаза обнаруживается главным образом в эндоплазматическом ретикулуме печени и почек; в дру-

Т а б л и ц а 12

Биохимические маркеры различных клеточных мембран

Органелла	Биохимический маркер
Плазматическая мембрана	Na, К-АТФаза, 5'-нуклеотидаза, аденилатциклаза
Эндоплазматический ретикулум	глюкозо-6-фосфатаза*, цитохром- P_{450} , НАДФН-дегидрогеназа, цитохром b_5
Митохондрии	
наружная мембрана	моноаминооксидаза
матрикс	малатдегидрогеназа
внутренняя мембрана	цитохром-с-оксидаза, сукцинатдегидрогеназа
Аппарат Гольджи	УДФ-галактозилтрансфераза
Лизосомы	кислая фосфатаза, кислые гидролазы
Пероксисомы	каталазы
Мембраны щелочной каемки	щелочная фосфатаза, сахараза
Синапсомы	ацетилхолинэстераза, ацетилхолиновые рецепторы

* Обнаруживается только в определенных тканях (печень, почках).

гих тканях количество этого фермента невелико, он, по-видимому, не может служить маркером органелл одного типа. В табл. 12 приведены маркерные ферменты различных субклеточных фракций.

Для определения происхождения той или иной субклеточной фракции или степени ее чистоты недостаточно использовать один тест, а желательно иметь подробное описание полученной фракции. В то же время, определяя активность маркерных ферментов, можно оценить степень загрязненности используемой фракции мембран примесями.

ВОПРОСЫ

1. Назовите принципы разделения клеточных органелл.
2. Для чего субклеточные фракции центрифугируют в градиенте плотности сахарозы или фикола?
3. Что такое маркерные ферменты?
4. Как выявляется латентная активность мембранного фермента?
5. Критерии очистки субклеточных фракций.

II.2. РАСПРОСТРАНЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР

Изучая процессы, протекающие в мембранных структурах, необходимо представлять их временные характеристики и одновременно временное разрешение методов, используемых для анализа. На рис. 26 проведено для примера сопоставление некоторых химических и физических реакций, имеющих отношение к функционированию мембран с диапазоном скоростей, доступных для измерения с помощью распространенных методов.

II.2.1. Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)

Принцип парамагнитного резонанса был открыт в 1944 г. профессором Е. К. Завойским. Как метод исследования подвижности (упорядоченности) макроструктур он стал применяться лишь после разработки синтеза стабильных нитроксильных радикалов, впервые полученных Э. Г. Розаппевым. Введение такого радикала в состав молекулы позволяет использовать ЭПР-зонды для характеристики микровязкости бислоя, степени упорядоченности и вращательной или поступательной подвижности меченых молекул в разных условиях. ЭПР-спектр «реагирует» на изменение не только анизотропии, но и скорости вращения метки, описываемое временем корреляции. Подвижность, измеряемая этим методом, находится в пределах 10^{-9} — 10^{-11} с.

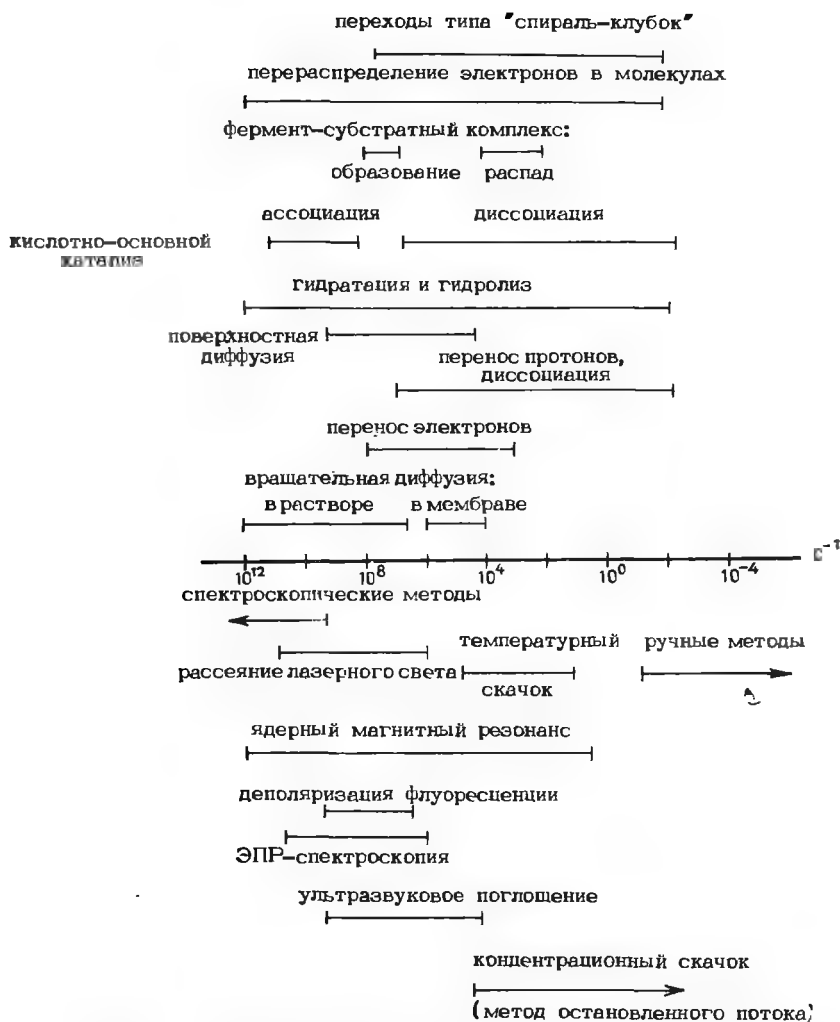


Рис. 26. Временные характеристики некоторых физических и химических реакций (А) и методов их исследования (Б)

Методы ЭПР-спектроскопии требуют дорогостоящего оборудования, однако сами измерения просты и высокоавтоматизированы: использование этого подхода весьма разнообразно. Так, вследствие того что наркомания во многих странах приобрела большое распространение, наркологические службы стали использовать высокочувствительные ЭПР-тесты для оценки склонности к морфину и его аналогам, а также для определения концентрации наркотиков в биологических жидкостях. Для этого используют высокоизбирательное определение морфина, включающее иммунологические

подходы в сочетании с ЭПР-спектроскопией. Используют антитела против морфина, соединенного с сывороточным альбумином. При их взаимодействии со спин-меченым морфином образуется прочный комплекс, имеющий спектр, характерный для иммобилизованной метки. Если среда, в которую вносится этот комплекс, содержит морфин, сигнал спектра ЭПР затухает вследствие обмена между молекулами свободного морфина и морфина в составе комплекса. Метод обладает высокой чувствительностью и избирательно позволяет выявить следовые количества наркотика.

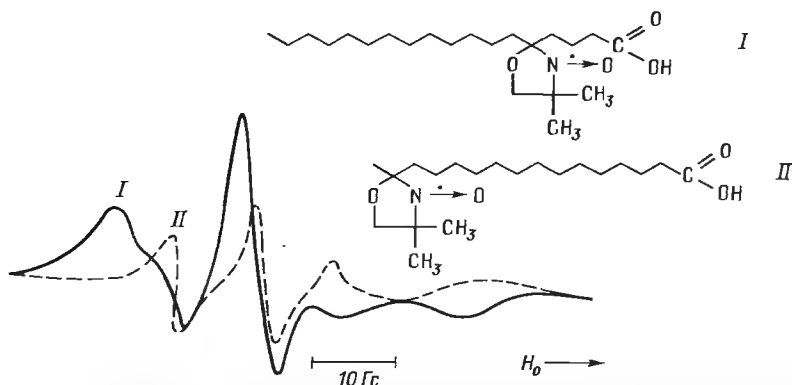


Рис. 27. Спектр ЭПР двух различных спин-меченых производных стеариновой кислоты, встроенных в мембрану эритроцитов. Стрелкой указано увеличение напряженности магнитного поля H_0

ЭПР-спектроскопия позволяет измерять плотность упаковки бислоя. Спин-меченые жирные кислоты, содержащие нитроксильную группировку на разном расстоянии от полярной COOH -группы, встраиваясь в бислой, ориентируются в поперечном направлении. Вид ЭПР-спектра этих зондов зависит от глубины погружения внутрь бислоя радикала с неспаренным электроном (рис. 27). Использование набора таких зондов позволяет оценить скорость вращательной подвижности и, соответственно, подвижность жирнокислотных цепей на разной глубине бислоя.

Спиновый радикал может быть введен в разнообразные соединения, локализацию которых в мембране легко предсказать, поэтому этим методом можно оценивать подвижность и взаимодействие между собой разных компонентов мембраны.

Однако метод имеет определенные ограничения. Результаты, полученные этим методом, не вполне согласуются с другими данными, полученными аналогичными подходами. Высокие концентрации спиновых зондов модифицируют бислой, а ковалентные метки, связываясь с белками, могут инактивировать их. В результате исследователь изучает мембрану не в нативном состоянии, а в том виде, который она принимает после модификации. Скорости процессов, описываемых с помощью этого подхода, много больше

тех, которые лежат в основе функционирования мембранных ферментов. Многие результаты, полученные с помощью ЭПР-спектроскопии, не находят однозначного объяснения.

II.2.2. Ядерно-магнитный резонанс (ЯМР)

В основе ЯМР-спектроскопии лежит поглощение электромагнитных волн ядрами, обладающими магнитным моментом, в радиочастотном диапазоне. Наиболее часто используют в исследованиях ^{13}C , ^1H , ^{31}P . Структура ЯМР-спектров определяется временем жизни различных спиновых состояний, величиной диполь-дипольного взаимодействия между данным ядром и соседними ядрами, неоднородностью магнитного поля и т. д. Характерным параметром ЯМР-спектров является величина химического сдвига δ ; иногда для анализа используют время релаксации τ_1 , связанное с δ соотношением $\delta=10-\tau$.

На ширину линий ЯМР-спектров влияет неоднородность магнитного поля, а полуширина обратно пропорциональна времени поперечной релаксации T_2 . Поэтому процессы релаксации, связанные с *диполь-дипольным взаимодействием* между ядрами, также могут служить мерой «подвижности» отдельных атомов в молекуле. Пики ЯМР лежат в радиочастотном диапазоне, а различия в частотах сигналов для разных изотопов намного превышают ширину сигнала поглощения. Спектры ЯМР малых молекул хорошо разрешимы. Так, спектр ЯМР молекулы холестерина позволяет идентифицировать резонанс каждого атома в отдельности и получить информации о подвижности различных участков молекулы в зависимости от ее окружения.

Параметр T_1 , характеризующий *процесс продольной* (спин-решеточной) *релаксации*, прямо пропорционален увеличению подвижности отдельных атомов. Таким образом, метод ЯМР позволяет с высокой точностью получить сведения об избирательном поведении отдельных частей молекулы. На рис. 28 указаны значения T_1 для отдельных атомов углерода в молекуле фосфатидилхолина. Увеличение T_1 соответствует возрастанию подвижности C—C-связей.

При переходе к более крупным молекулам спектры ЯМР сильно усложняются и зачастую становятся неразрешимыми. Так, ЯМР-спектроскопия белков в лучшем случае позволяет охарактеризовать подвижность отдельных групп молекулы, например окружение фосфорного радикала в активном центре *трансфераз* и т. п. Другой недостаток ЯМР-спектроскопии — довольно низкая чувствительность (концентрация образца должна быть не менее 10^{-3} моль/л, в то время как оптические методы позволяют получить информацию о молекулах, концентрация которых составляет 10^{-6} — 10^{-7} моль/л).

Сопоставление подвижности жирнокислотных цепей в бислое, осуществляемое разными способами, вскрывает различия между методами ЭПР- и ЯМР-спектроскопии (рис. 29). Судя по резуль-

татам измерений спектров ЭПР, можно заключить, что упорядоченность падает, а подвижность соответственно монотонно растет в направлении от эфирной связи к метильному концу молекулы. ЯМР-спектроскопия показывает, что область, примыкающая к сложноэфирной связи, характеризуется определенной жесткостью, и снижение упорядоченности наступает при движении по жирнокислотной цепи к метильному концу, начиная с C_6 -атома. Анало-

T_1	структурная формула фосфолипида	
3,3	CH_3	CH_3
1,8	CH_2	CH_2
1,1	CH_2	CH_2
0,6	$(\text{CH}_2)_{10}$	$(\text{CH}_2)_{10}$
0,2	CH_2	CH_2
0,1	CH_2	CH_2
	$\text{C}=\text{O}$	$\text{C}=\text{O}$
	O	O
0,1	CH_2 —	$\text{CH} — \text{CH}_2$
		O
		$\text{O} — \text{P} = \text{O}$
		O
0,3		CH_2
0,3		CH_2
0,7		$\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$

Рис. 28

Рис. 29. Зависимость параметра упорядоченности S от положения метки в ацильном хвосте спимеченой декановой кислоты: 1 — по результатам ЭПР-, 2 — по данным ЯМР-спектроскопии (n — положение метки у атома углерода, считая от карбоксильной группы)

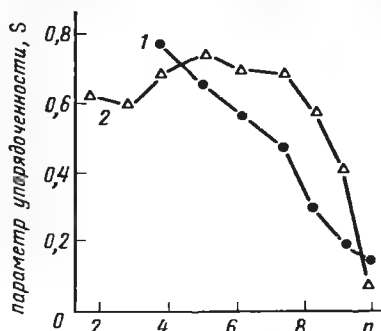


Рис. 29

Рис. 28. Величины подвижности T_1 для различных атомов углерода в молекуле фосфатидилхолина в составе мембраны при температуре выше критической (расчитаны по данным ЯМР-спектроскопии)

гичные результаты получены и при анализе подвижности дейтерированных фосфолипидов в мембранном бислое. Причины различий в оценке подвижности фосфолипидов в мембране, выявляемых при сравнении двух методов, заключаются, вероятно, в том возмущающем влиянии, которое спиновые зонды оказывают на упаковку бислоя. Кроме того, временные характеристики подвижности, измеряемые методами ЭПР- и ЯМР-спектроскопии, сильно различаются (см. рис. 26).

Несмотря на то что для изучения мембранных белков ЯМР-спектроскопия оказалась не столь эффективна, этот подход часто используют как немодифицирующий метод изучения мембранных структур. Столь же перспективны и другие немодифицирующие методы в мембранной биологии — метод кругового дихроизма и метод сканирующей калориметрии.

II.2.3. Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм

При прохождении через оптически активный образец монохроматического линейно поляризованного света происходит поворот плоскости поляризации электрического вектора. Угол, на который поворачивается эта плоскость, может быть измерен с помощью поляризаторов. Основной вклад в спектры *дисперсии оптического вращения* благодаря спиральным участкам вносят белки. Эту характеристику используют чаще всего для определения относительного содержания α -спиралей в белках. Однако существует ряд факторов, влияющих на характер спектров и являющихся источником возможных ошибок. Прежде всего бывает трудно учесть влияние окружающей среды на спектр дисперсии оптического вращения белка. Кроме того, надо иметь в виду наличие в молекулах исследуемых белков деформированных неспиральных участков и разный вклад в спектр длинных и коротких спиралей, а также то, что между реальными (природными) белками и их синтетическими аналогами, используемыми в качестве «*эталонов спиральности*», невозможно достичь структурной эквивалентности.

Величина *кругового дихроизма*, характеризующая обычно эллиптичностью, представляет собой разницу в поглощении образцом право- и левополяризованного света. Она объясняется различиями в коэффициентах молярной экстинкции право- и левополяризованного по кругу света.

Спектры кругового дихроизма используют для тех же целей, что и спектры дисперсии оптического вращения, чтобы выяснить, какой тип вторичной структуры преобладает в мембранных белках. При интерпретации спектров кругового дихроизма возникают некоторые трудности, которые связаны в основном с неомогенностью мембранных суспензий, обуславливающей сглаживание спектральных кривых. Несмотря на то что доля спиральных участков в молекуле белка представляется на первый взгляд не самым информативным параметром, с помощью этих методов можно выяснить, осуществляется ли прямое влияние на мембранные структуры внешних факторов, если это влияние изменяет спирализацию белковых молекул. Эти изменения часто имеют место в тех случаях, когда наблюдается собственный конформационный сдвиг в молекуле белка или взаимодействие молекул белка друг с другом, изменяющее их конформацию.

II.2.4. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Значение теплоты, выделяемой или поглощаемой в процессе химической реакции при постоянном давлении, можно использовать для оценки прочности химической связи. Изменение физического (фазового) состояния вещества при постоянном давлении

также может сопровождаться поглощением или выделением тепла; полагают, что эти изменения отражают *молекулярную реорганизацию* образца. Таким образом, изменения конформации макромолекул можно измерять, регистрируя тепло, выделяемое или поглощаемое при конформационных переходах.

Поскольку фазовый переход в липидных мицеллах сопровождается выделением или поглощением тепла, его также можно регистрировать с помощью данного метода. Для вычисления энергии, затрачиваемой на изменение фазового состояния вещества, необходимо из регистрируемого поглощения (или выделения) системой тепла вычесть тепло, поглощаемое (или выделяемое) ею в отсутствие фазовых переходов, — собственную теплоемкость.

Принцип метода *дифференциальной сканирующей калориметрии* состоит в измерении тепла, необходимого для увеличения температуры объекта на очень малую величину при непрерывном повышении температуры объекта. Вклад теплоемкости, которая в узком температурном интервале является постоянной, вычитается, а итоговая величина характеризует «энергетическую стоимость» фазовых переходов.

Современные чувствительные калориметры позволяют измерять фазовые переходы в водно-липидных дисперсиях в небольших (несколько миллиграмм) порциях материала. Применение этого метода для исследования простых искусственных систем (мицелл, везикул, бислои которых образованы из фосфолипидов заданного вида) дало ценную количественную информацию о принципах организации бислоя.

Было обнаружено, что в бислоях индивидуальных фосфолипидов критическая температура ($T_{кр}$) для фазового перехода занимает доли градуса. В смеси фосфолипидов область фазового перехода занимает 1—2°. Некоторые фосфолипиды плохо смешиваются друг с другом, например если их жирнокислотные цепи отличаются по длине более чем на 4 атома С. Не смешиваются также *глицерофосфолипиды* и *сфингофосфолипиды*; пики, характеризующие их фазовые переходы, регистрируются на термограммах отдельно. Добавление к таким образцам холестерина способствует образованию фазы со смешанными свойствами, при этом фазовый переход уже не выявляется. В фосфолипидах смешанного состава, образующих одну фазу, величина $T_{кр}$ представляет собой, как и энтальпия фазового перехода, характеристику этой смеси.

На величину $T_{кр}$ влияют *длина жирнокислотных цепей* в молекуле (чем больше атомов углерода в жирнокислотном радикале, тем выше температура перехода) и степень ее гидратации. Обводнение бислоя снижает температуру фазового перехода.

Анализ термограмм некоторых фосфолипидов выявляет перед наступлением области фазового перехода так называемый *предпереход* (рис. 30). Он устраняется добавкой в смесь фосфатидилэтноламина или кислых фосфолипидов, а также снижением содержания воды в системе. Первоначально предпереход объясняли

увеличением свободы вращения полярных голов липидов. В настоящее время считают, что предпереход вызван образованием морщин и складок бислоя, выявляющихся при изменении объема, занимаемого каждой молекулой, толщины бислоя и связываемости воды с его компонентами. При охлаждении образца состояния, соответствующего предпереходу, не обнаруживается (см. рис. 30).

В смеси фосфатидилхолина с пальмитиновой кислотой температура фазового перехода ($T_{кр}$) оказывается выше, чем для любого из компонентов. Объясняется это обстоятельство тем, что в жидком состоянии компоненты идеально смешиваются, а в состоянии геля образуют комплекс. Также и в случае смеси L и D соединений $T_{кр}$ рацемата выше. Эти данные показывают, что с помощью сканирующей спектроскопии можно обнаружить также взаимодействие компонентов смеси.

Рис. 30 показывает, что термограмма нагревания мембранных образцов отличается от термограммы их охлаждения. Это явление носит название *гистерезиса* липидных систем и объясняется «памятью» липидов. Одна из причин такой памяти заключается в неодинаковости энергии гидратации и дегидратации липидного бислоя.

Для нативных мембран ценность метода дифференциальной сканирующей калориметрии ниже, чем для искусственных систем. Высокое содержание холестерина в плазматических мембранах не позволяет выявить отчетливых изменений теплопродукции в области фазовых переходов. В случае внутриклеточных мембран фазовые переходы не обнаруживаются по другой причине — эти мембраны оказываются достаточно «жидкими» в широком интервале температур (5—60°C).

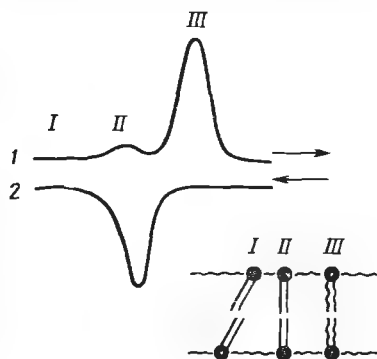


Рис. 30. Схематическое изображение гелеобразного (I), переходного (II) и жидкокристаллического (III) состояния бислоя в ходе изменения температуры. Термограммы характеризуют переход между этими состояниями при увеличении (1) и уменьшении (2) температуры

II.2.5. Метод рентгеновского рассеивания нейтронов

При наличии необходимого оборудования этот метод очень хорош для определения фазового состояния упаковки бислоя.

Хотя калориметрический анализ и дает информацию для понимания фазового состояния вещества и характеристики фазовых переходов, он ничего не говорит о характере упаковки бислоя до

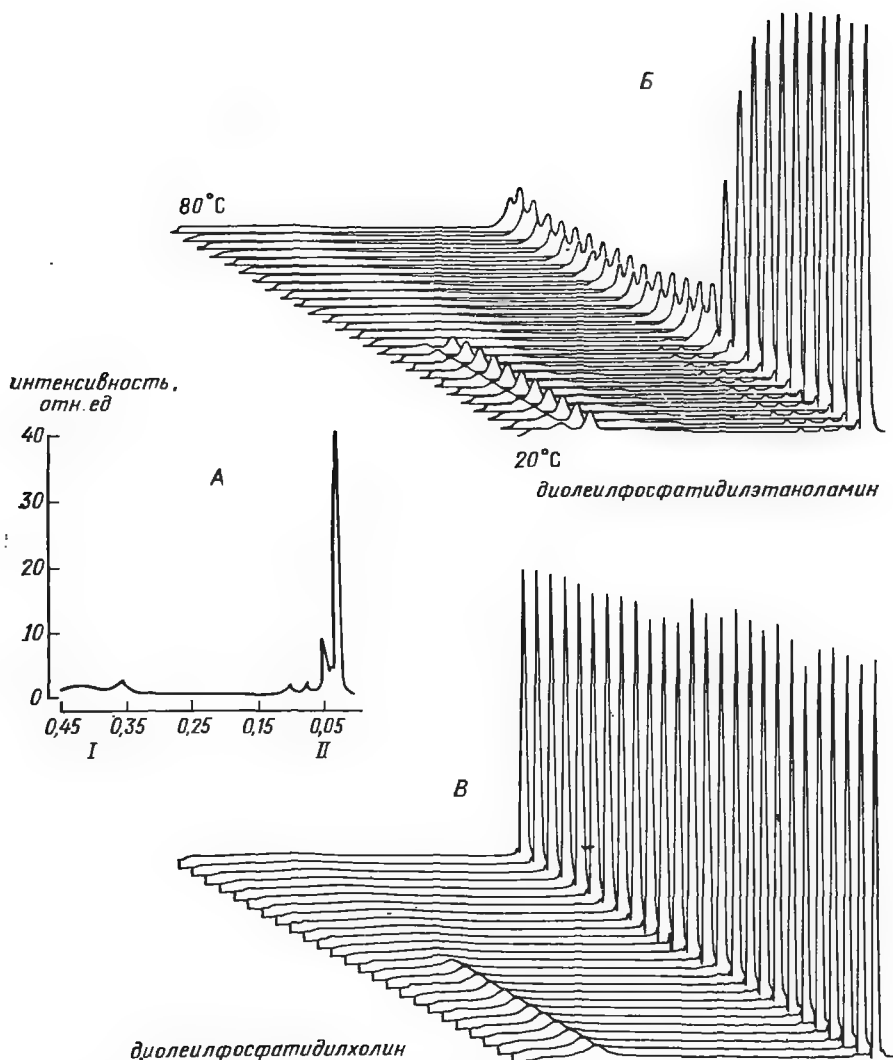


Рис. 31. Характеристика липидных структур с помощью анализа рассеивания нейтронов от исследуемого образца под разными углами: *A* — зависимость интенсивности рассеивания от тангенса угла (индивидуальная рентгенограмма). Область I характеризует расположение молекул относительно друг друга и расстояние между ними; область II — толщину структуры и тип ее организации (ламеллярная, гексагональная и т. д.); *B* — набор рентгенограмм, отражающий изменение упаковки бислоев диолеилфосфатидилэтанолamina при изменении температуры от 20 до 80°C; *B* — то же для диолеилфосфатидилхолина (Franks, Levine, 1981; Tenckov, Quinn, 1988)

и после температурных переходов. Измерение рассеивания потока нейтронов, прошедшего через образец, требует использования моноэнергетического пучка частиц, который обеспечивается при использовании синхротрона. При этом время, необходимое для регистрации одной рентгенограммы, исчисляется несколькими микросекундами, так что при фазовых переходах, вызванных температурным скачком, можно измерять кинетику этого перехода. Рассеивание под малыми углами характеризует толщину бислоя и расстояние между слоями, под большими углами — характер упаковки кристаллографической ячейки и дает основание судить о переходах между разными фазами — гексагональной, ламеллярной, кубической и т. д. (рис. 31). Метод *рентгеновского рассеивания нейтронов* и калориметрия в комбинации дают хорошее описание физики фазовых переходов, но лишь для относительно простых систем, состоящих из регулярно повторяющихся ячеек.

II.2.6. Флуоресцентная спектроскопия

Световая волна, сталкиваясь с молекулой какого-либо вещества, либо рассеивается (изменяет направление движения), либо поглощается (передает свою энергию молекуле). При этом молекула переходит в возбужденное состояние. Энергия, поглощенная молекулой, может перейти в тепло (в результате столкновения с другими молекулами) или излучиться в виде света. Какое именно событие из указанных здесь будет иметь место, — определяется состоянием молекулы в момент столкновения. Возбужденные электроны возвращаются на основной уровень двумя путями: либо испуская свет, либо с помощью безызлучательного перехода. В случае излучательного перехода испускаемый свет обладает меньшей энергией и большей длиной, так как часть энергии теряется; при этом наблюдается так называемый *стоксов сдвиг*.

Эффективность флуоресценции (вероятность излучательного перехода) характеризуется квантовым выходом θ , равным отношению числа излученных фотонов к числу поглощенных. Величину θ , как и стоксов сдвиг, определяют и внутренние и внешние факторы. Например, θ в случае *транс*-изомеров в несколько раз выше, чем *цис*-изомеров флуоресцирующих молекул. К числу внешних факторов относится столкновение с молекулой тушителя (*динамическое тушение*) или образование комплекса флуоресцентной молекулы с тушителем (*статическое тушение*).

Первый процесс (излучательный переход) зависит от вязкости среды и может быть использован для ее измерения. Тушителями флуоресценции являются *тяжелые анионы или катионы* (I^- , Br^- , Cs^+ , Cu^{2+}), парамагнетики (Mn^{2+} , нитроксильные радикалы). Кроме того, наблюдается тушение флуоресценции в полярных растворителях, например в воде.

Второй случай — безызлучательный переход в основное состояние — происходит, если наиболее высокий колебательный

подуровень основного состояния имеет ту же энергию, что и низкий колебательный уровень возбужденного состояния. Такой переход характерен для «гибких» молекул. У «жестких» молекул, содержащих ароматические кольца, чаще всего наблюдается излучение части поглощенной энергии. Переход молекулы в возбужденное состояние сопровождается изменением дипольного момента молекулы. Это в свою очередь поляризует электронные оболочки окружающих молекул, что приводит к смещению атомов и переориентации молекул. Затрата энергии на эти процессы и приводит к длинноволновому сдвигу. Стоксов сдвиг будет тем больше, чем больше: 1) изменение дипольного момента молекулы при возбуждении, 2) время жизни молекулы в возбужденном состоянии, 3) поляризуемость окружающих молекул.

В некоторых случаях возбужденная молекула, сталкиваясь с идентичной невозбужденной молекулой, образует комплекс — *эксимер*. При этом из плоских молекул возникают структуры типа сэндвича, которые стабилизируются переносом заряда от одной молекулы к другой. На перенос заряда тратится часть энергии поглощенного кванта, поэтому эксимер флуоресцирует в более длинноволновой области. Степень эксимеризации зависит от концентрации хромофора, температуры и вязкости окружающей среды.

Распространенным флуоресцентным зондом, используемым для измерения микровязкости мембран по легкости его эксимеризации, является *пирен* (рис. 32). Пирен концентрируется в гидрофобных компартментах мембраны, располагаясь между жирнокислотными цепями липидов, его эксимеризация пропорциональна подвижности молекул в бислое, поэтому при прочих равных условиях и неизменной концентрации пирена его эксимеризация может служить характеристикой микровязкости мембраны.

Понижение температуры увеличивает микровязкость бислоя, ограничивает подвижность молекул пирена и снижает уровень его эксимеризации. При возрастании температуры подвижность жирнокислотных цепей в сердцевине бислоя возрастает, увеличивается и вероятность встречи молекул пирена. Изучение зависимости эксимеризации пирена в мембранах от температуры (или других факторов) позволяет выяснить относительную микровязкость мембранных структур и выявить область критических температур, при которых наблюдается фазовый переход в мембранах (рис. 33).

Тушение флуоресценции иногда представляет собой результат дальней безызлучательной передачи (так называемого резонансного переноса) энергии. В этом случае система содержит два флуоресцирующих хромофора, причем спектр испускания одного из них (донор) должен перекрываться со спектром поглощения другого (акцептор). При наличии переноса энергии интенсивность флуоресценции донора снижается, а акцептора увеличивается. Эффективность переноса зависит от дистанции между донором и акцептором, и это явление может быть исполь-

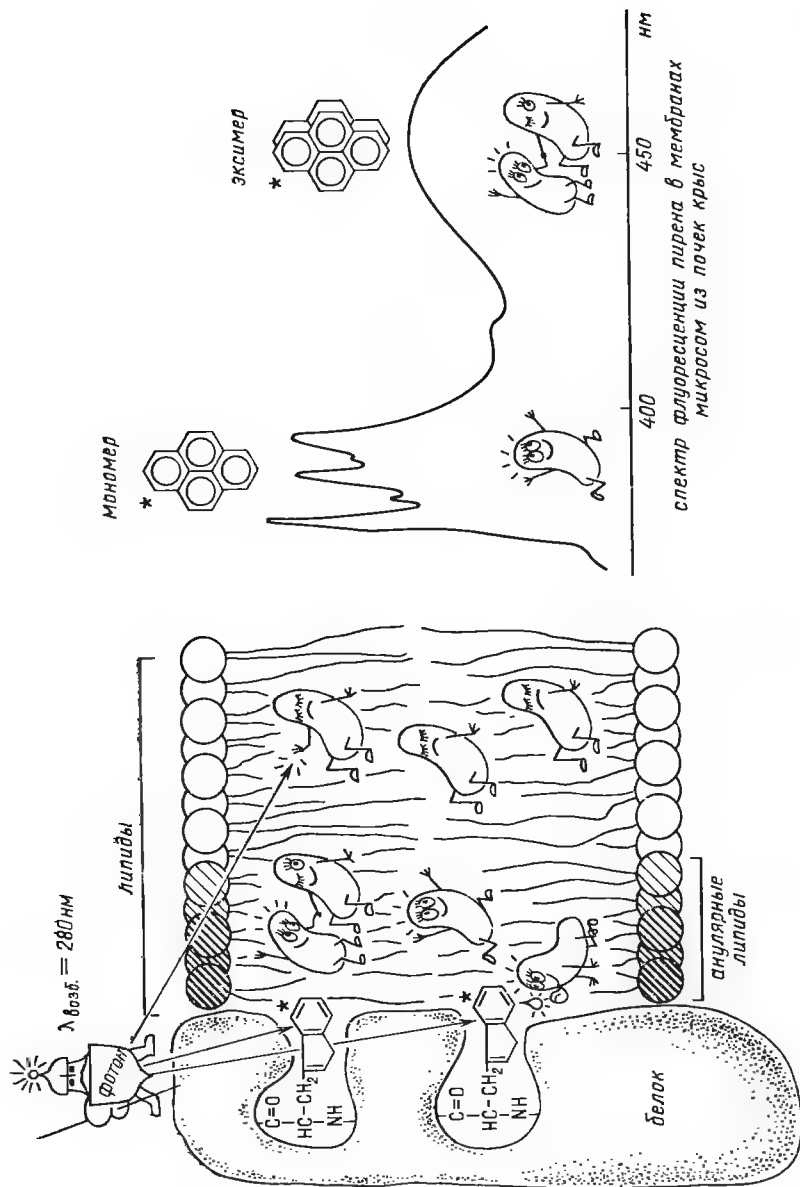


Рис. 32. Схема, иллюстрирующая собственную и вызванную флуоресценцию пирена и образование его эксимеров в мембранном бислое

зовано для определения расстояния между определенными группами в мембране с помощью своеобразной «спектроскопической линейки». Такой «линейкой» может являться пирен. С его помощью можно измерить упорядоченность аннулярного слоя липидов и оценить характер межбелковых взаимодействий в мембране (см. рис. 32).

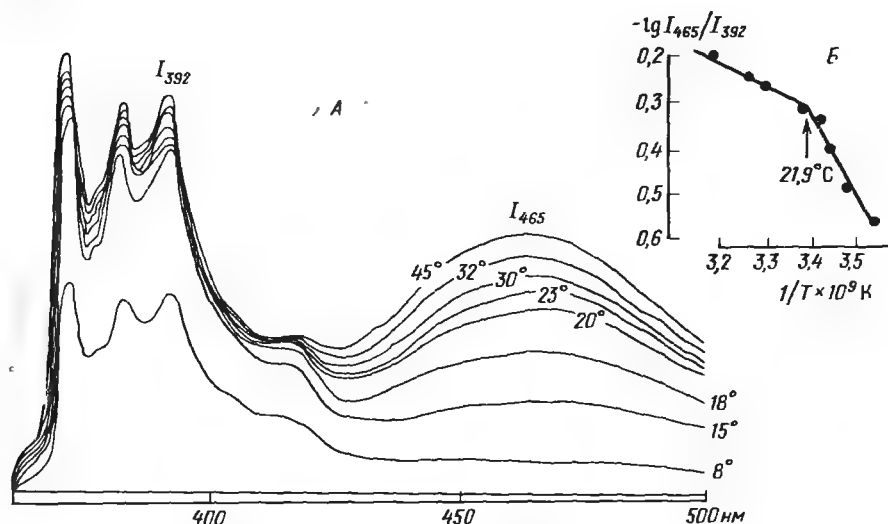


Рис. 33. Спектры флуоресценции пирена в мембранах микросом почек при разных температурах с указанием максимума флуоресценции мономерной (I_{392}) и эксимерной (I_{465}) форм (А) и график Аррениуса для эксимеризации пирена в исследуемом образце (Б). Область перегиба на графике соответствует температуре фазового перехода

Область возбуждения пирена перекрывается с областью испускания *триптофанильных радикалов* белка — 330—335 нм. Если мембранные белки содержат триптофанильные радикалы и обладают собственной флуоресценцией, частично она будет тушиться теми молекулами пирена, которые могут подойти к белковым хромофорам на расстояние радиуса Ферстера — 15—20 Å. Следовательно, освещая пробу в области возбуждения триптофанильных остатков (280 нм) и исследуя тушение белковой флуоресценции и возгорание флуоресценции пирена, можно оценить доступность белку той порции пирена, которая локализуется в аннулярном слое. Образование белковых ассоциатов, сопровождающееся снижением доли аннулярных липидов вследствие их вытеснения из области межбелковых контактов, будет защищать собственную флуоресценцию триптофанильных радикалов белка от тушения пиреном.

Эксимеризация пирена в области аннулярного слоя осуществляется с гораздо большими ограничениями, что свидетельствует,

по-видимому, о большой упорядоченности аннулярного слоя липидов.

Флуоресцентные методы часто применяются для определения параметров, характеризующих связывание хромофора с мембраной. Для этого используют 1-анилин-8-нафталинсульфонат (АНС) — первый зонд, примененный Д. Лоуренсом в 1952 г. для исследования мембранных структур. В неполярном окружении интенсивность флуоресценции этого зонда заметно возрастает, и максимум ее сдвигается в область более коротких длин волн. При правильно выбранной области возбуждения и флуоресценции практически вся флуоресценция будет исходить от зонда, связанного с мембраной. Связывание заряженных молекул зонда с мембраной зависит от плотности заряда на ней и может быть использовано для определения этого параметра, а также величины трансмембранного потенциала. рН-чувствительные флуоресцентные зонды (производные акридина) применяют для измерения градиента рН на мембране.

Различные модификации флуоресцентной спектроскопии с успехом используют в биохимии мембран для характеристики белок-липидных взаимодействий и подвижности мембранных белков в процессе их функционирования. Один из примеров такого рода — расчет подвижности белковых молекул из величин *поляризации флуоресценции*. Для измерения используют флуорофоры с хорошим квантовым выходом, способные избирательно модифицировать химические группы белка (дансилхлорид, атакующий NH_2 -группы, или эритрозин, присоединяющийся к SH-группам белка). Поляризацию флуоресценции P определяют (в стационарном режиме при непрерывном освещении образца) из уравнения

$$P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}),$$

где $I_{\parallel}$ и $I_{\perp}$ — величины интенсивности флуоресценции в стационарном состоянии при вертикальной и горизонтальной поляризации света.

Время вращательной корреляции определяют из графика зависимости величины P от температуры. В последние годы разработаны методы, позволяющие измерять поляризацию флуоресценции в нестационарных условиях методом флэш-фотолиза. Наносекундная вспышка лазерного луча нужной длины волны и высокой интенсивности позволяет отделить во времени возбуждающий свет от испускаемого и устранить как повреждения белков постоянным освещением, так и вклад рассеивания в измеряемые параметры. Безынерционные системы регистрации флуоресценции соединяют с быстродействующим анализатором. Такой комплекс аппаратуры одновременно с регистрацией поляризации флуоресценции позволяет рассчитать и время вращательной корреляции $\tau_{\text{вр}}$. Ниже приведены значения времени вращательной корреляции для некоторых белков (табл. 13). Из данных таблицы видно, что эта величина коррелирует с размерами белков и изменяется под влиянием условий среды. Например, мембранный бислой ограничивает

Время вращательной корреляции некоторых белков (25°C)

Белок	Молекулярная масса, кДа	$\tau_{вр}$
Апомиоглобин	17	8,3 нс
β -Лактоглобулин (мономер)	18	8,5 »
Трипсин	25	12,9 »
β -Лактоглобулин (димер)	36	20,3 »
Сывороточный глобулин	66	41,7 »
Макроглобулин	900	80 »
Са-АТФаза (мембраносвязанная)	100	62 мкс
То же, в присутствии АТФ		30 »
То же, при повышении температуры до 45°C		28 »

вращательную подвижность белков, которая существенно зависит от температуры и присутствия субстрата.

Флуоресцентные методы находят широкое и разнообразное применение в мембранной биохимии. Так, введение *хлортетрациклина*, который вследствие своей гидрофобности концентрируется в мембранах, в среду с мембранными фрагментами обнаруживает флуоресценцию, количественно отражающую аккумуляцию кальция мембранными насосами. Это позволяет использовать хлортетрациклин для контроля за скоростью перемещения Ca^{2+} через мембрану.

ВОПРОСЫ

1. Назовите различные физические методы, позволяющие оценить состояние (подвижность, свойства и т. д.) белковых и липидных компонентов мембраны, и укажите методы, временные параметры которых позволяют исследовать эти системы.
2. Существуют ли различия в результатах исследования мембран методами ЭПР, ЯМР и флуоресцентной спектроскопии?
3. Каким методом можно оценить белок-липидные взаимодействия в биологических мембранах?
4. Какие физические методы пригодны для оценки фазового состояния липидов в мембране?
5. Как зависит поведение белков в бислое от его фазового состояния и какими методами это можно оценить?

II.3. МЕМБРАНОТРОПНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Известен целый набор разнообразных *мембранотропных веществ* (как правило, гидрофобных), способных, взаимодействуя с мембраной, изменять ее свойства. В их числе соединения, нарушающие целостность мембраны и делающие ее проницаемой для ионов, — *ионофоры* и *каналоформеры*.

Флуоресцентные Са-комплексоны *квин-2*, *фура-2* и другие можно использовать для измерения концентрации ионизированно-

го кальция в клетке или в органеллах. Благодаря наличию гидрофобного «хвоста» они легко проникают через клеточную мембрану. В результате этого они накапливаются внутри клетки, так как мембранные гидролазы отщепляют от молекул гидрофобные ацильные хвосты и лишают их способности проникать через мембрану. В цитоплазме эти вещества соединяются с ионизированным кальцием, что изменяет их спектральные свойства. По изменениям спектра можно измерить количество ионизированного Ca^{2+} , доступного для взаимодействия с комплексом.

Важная роль Ca^{2+} в регуляции метаболизма все более увеличивает число примеров использования флуоресценции для изучения этого процесса. *Кальмодулин* — белок, регулирующий Ca -чувствительность многих клеточных ферментов, является мощным модулятором клеточных (мембранных) процессов. Долгое время исследователи не находили методов, позволяющих контролировать его функции. Оказалось, что при взаимодействии с кальцием кальмодулин переходит в активное состояние, изменяя свою конформацию; этот конформационный переход отражается на параметрах флуоресценции хромофора, если таковой присоединить к молекуле кальмодулина. Простой способ сделать функции кальмодулина «видимыми» — дансирование. Дансил-кальмодулин обладает специфическим спектром флуоресценции, чувствительным к присутствию двухвалентных ионов, а также белков и мембранных липидов, с которыми он способен связываться. Таким образом, можно оценить связывание с кальмодулином гидрофобных лигандов.

Первые природные ионофоры и каналообразователи были обнаружены как антибиотики — они вырабатываются микроорганизмами в качестве «оружия» против врагов в «борьбе за существование». В настоящее время структура многих из них расшифрована, синтезированы их искусственные аналоги, зачастую более эффективные, чем природные (рис. 34).

Д. Н. Островский считает, что название «антибиотики» не отражает биологического значения этих природных модификаторов бактериальных мембран. По его мнению, так называемые «антибиотики» являются сигнальными соединениями, обеспечивающими возможность для бактериальных клеток обмениваться информацией через образуемые молекулами антибиотиков каналы. Островский предлагает называть соединения этого класса *симбиотиками*. В мембранологии эти вещества используют для индукции избирательной или неизбирательной проницаемости мембранных структур.

Валиномицин — циклический депсипептид формулы (D-вал- α -лактат-L-вал-D-гидроксизовалерат)₃, обладающий исключительно высокой селективностью к K^+ и обеспечивающий его проникновение через мембраны. *Нактины* — циклические полиэферы неактиновой кислоты, классифицируемые по числу присоединенных к лактонным кольцам этильных радикалов, их комплексы с Na^+ и K^+ обладают различной устойчивостью, поэтому в их присутствии

на мембране может создаваться Na/K-градиент. *Нигерицин* и *моненсин* являются заряженными линейными структурами, но образуют нейтральный циклический гидрофобный комплекс с переносимым ионом; они способны осуществлять K/H-обмен через мембрану. *Крауны* — макроциклические полиэфиры, обладающие коронобразной структурой. Синтезированы крауны, обладающие приемлемой избирательностью для Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . A23187 и X537A — ионофоры, считающиеся высокоселективными переносчиками Ca^{2+} . Однако для них показан ряд побочных эффектов, требующих осторожности в интерпретации их действия.

В последнее время находит широкое применение для исследований транспорта Ca^{2+} через биологические мембраны антибиотик *иономицин*. Этот ионофор выделяют из *Streptomyces conglobatus*, он активен против грамположительных, но не против грамотрицательных бактерий; связывает Ca^{2+} со стехиометрией 1:1; различает Ca^{2+} и Mg^{2+} лучше, чем A23187, в то же время связывает Sr^{2+} , Ba^{2+} и одновалентные катионы незначительно. Ввиду высокого сродства к Ca^{2+} и своей липофильности иономицин способен переводить Ca^{2+} из водной фазы в гидрофобную. От других полиэфирных антибиотиков его отличают два достоинства: выраженная способность поглощать свет при 300 нм и отсутствие собственной флуоресценции, что позволяет использовать флуоресцентные методы для определения Ca^{2+} в его присутствии.

Список ионофоров может дополнить ряд жирорастворимых слабых кислот типа 2,4-динитрофенола, являющихся протонофорами при pH, близких к величинам pK их кислотных групп.

Из каналообразователей, которые образуют неселективные структуры, способные пронизывать мембрану, наиболее распространены *грамидины*, *аламетицин*, *амфотерицин В*, *филипин*. Одни из этих соединений, такие, как *грамидины*, формируют

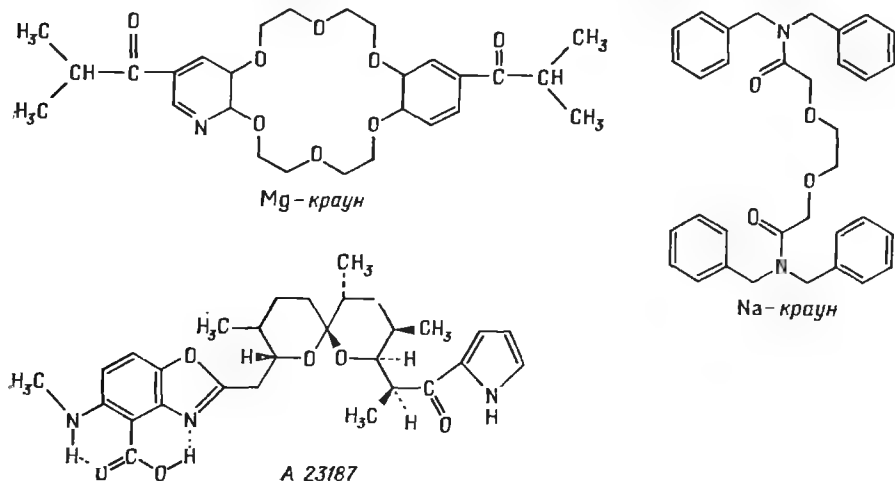
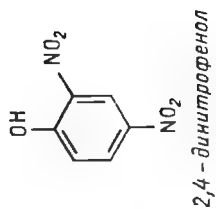
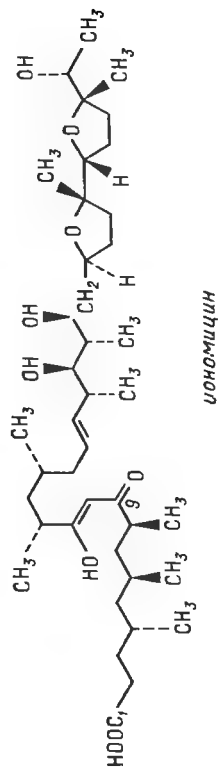
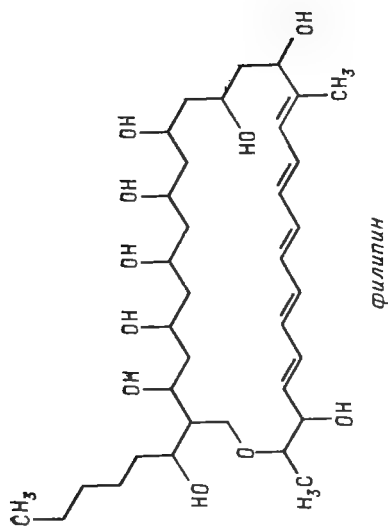
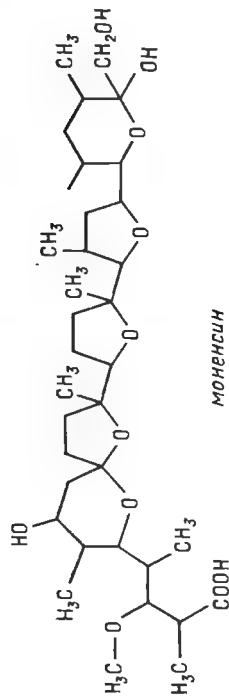
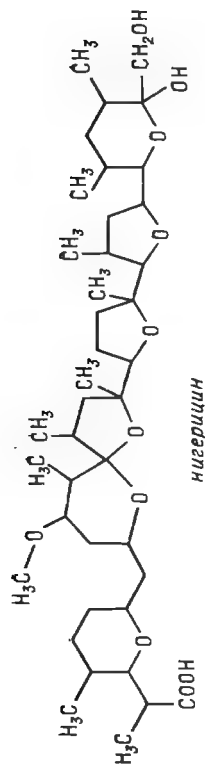


Рис. 34. Структура некоторых ионофоров



структуру канала независимо от компонентов мембраны, другие — как амфотерицин В или филиппин, формируют канал вместе с молекулами холестерина. По этой причине они не взаимодействуют с мембранами, обедненными холестерином. Некоторые каналообразователи несут нескомпенсированный (свободный) заряд; время жизни формируемых ими каналов зависит от мембранного потенциала.

Интересен тот факт, что размер каналов, образуемых аламетицином, зависит от его концентрации, поскольку увеличение концентрации приводит к включению большего количества молекул антибиотика в единственный канал.

Существует целый ряд способов модификации фосфолипидного бислоя, в результате которых изменяются *асимметрия, градиент гибкости, микровязкость, подвижность компонентов* бислоя или его состав. Ниже будут представлены некоторые способы модификации, которые могут применяться как в процессе регуляции метаболизма, так и для исследования свойств нативных мембран.

К группе модификаторов, изменяющих липидный состав мембран, относятся липидпереносящие белки, ферменты обмена фосфолипидов — фосфолипазы, метилазы и пр., а также системы обмена холестерина. Вследствие их деятельности осуществляется выраженное изменение содержания лизоформ отдельных липидов, накопление в бислое жирных кислот, обладающих детергентным действием, изменение отношения фосфатидилхолин : фосфатидилэтаноламин или фосфолипидов к холестерину. Все эти факторы, как отмечалось ранее, управляют микровязкостью мембраны и подвижностью ее компонентов. Изменение микровязкости оказывается существенным не только для состояния внутримембранных структур, но и для взаимодействия мембран друг с другом. Так, агрегация тромбоцитов среди прочих факторов предшествуют активация фосфолипазы и накопление лизофосфолипидов, облегчающее межмембранные контакты.

Лизофосфатидная кислота представляет собой модификатор тромбоцитов, одновременно она является Са-ионофором. А 23187 также вызывает агрегацию тромбоцитов. По этой причине полагали, что оба фактора действуют по одному механизму и что образование клеточных агрегатов на мембране происходит в результате устранения заряда вследствие повышения проницаемости для кальция.

Однако проверка этой гипотезы показала, что агрегирующие и ионофорные свойства лизофосфатидной кислоты различаются на 2 порядка (10^{-8} — 10^{-7} М обеспечивают агрегацию, а 10^{-5} М — ионофорную активность), а у А 23187 эти концентрации совпадают. По-видимому, лизофосфатидная кислота обеспечивает агрегацию тромбоцитов за счет возрастания жидкостности мембраны.

Многие средства, в том числе и считавшиеся избирательными, способны влиять непосредственно на физико-химическое состояние

бислая. Так, вещества фенотиазинового ряда, которые были введены в кардиологическую практику как специфические *антиаритмические* и *гипотензивные* средства, подавляющие функциональную активность кальмодулина, оказались агентами с гораздо более широким действием. Одно из наиболее активных соединений этого ряда *трифторперазин* (трифтазин) может взаимодействовать с целым рядом Са-зависимых мембранных белков, ограничивая их подвижность в мембране и затрудняя функционирование. Другой представитель фенотиазинов — *хлорпромазин* — способен взаимодействовать непосредственно с фосфолипидными компонентами мембраны и холестерином. *Дефенилгидантоин*, применяемый при лечении шизофрении, также является выраженным мембранным модификатором.

ВОПРОСЫ

1. *Что такое мембранотропные вещества? Приведите примеры.*
2. *Как измерить концентрацию ионизированного кальция в живой клетке?*
3. *Дайте пример ионофоров и каналоформеров. В чем разница между ними?*
4. *Что такое антибиотики, как они влияют на мембрану бактерий?*
5. *Какие свойства мембранного бислая изменяются при модификации мембран и какими способами можно зафиксировать эти изменения?*

II.4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЕТЕРГЕНТОВ В МЕМБРАНОЛОГИИ

Мембранные структуры могут быть подвергнуты *солюбилизации*. Этот процесс обеспечивается детергентами — группой амфифильных соединений, способных связываться с мембранным белком гидрофобными связями, одновременно взаимодействуя полярными группами с водой. В результате молекулы детергента сначала разрыхляют мембрану, при повышении их концентрации образуют смешанные мицеллы, а затем и детергент-белковые комплексы (рис. 35). В ряде случаев при замене липидного окружения на детергент белок сохраняет хотя бы некоторые свои функции.

По способности к мезоморфизму *детергенты* делят на две группы. К группе *А* относятся детергенты, молекулы которых способны образовывать мицеллярные и аналогичные структуры (додецилсульфат Na, цетилтриметиламмоний бромид, тритоны, бриджи, лубролы). К приведенным детергентам группы *А*, обнаруживаемым в тканях животных, относятся жирные кислоты и лизофосфолипиды. К группе *В* относят детергенты, не способные к отчетливому мезоморфизму (холат Na, дезоксихолат Na, дигитонин, сапонин).

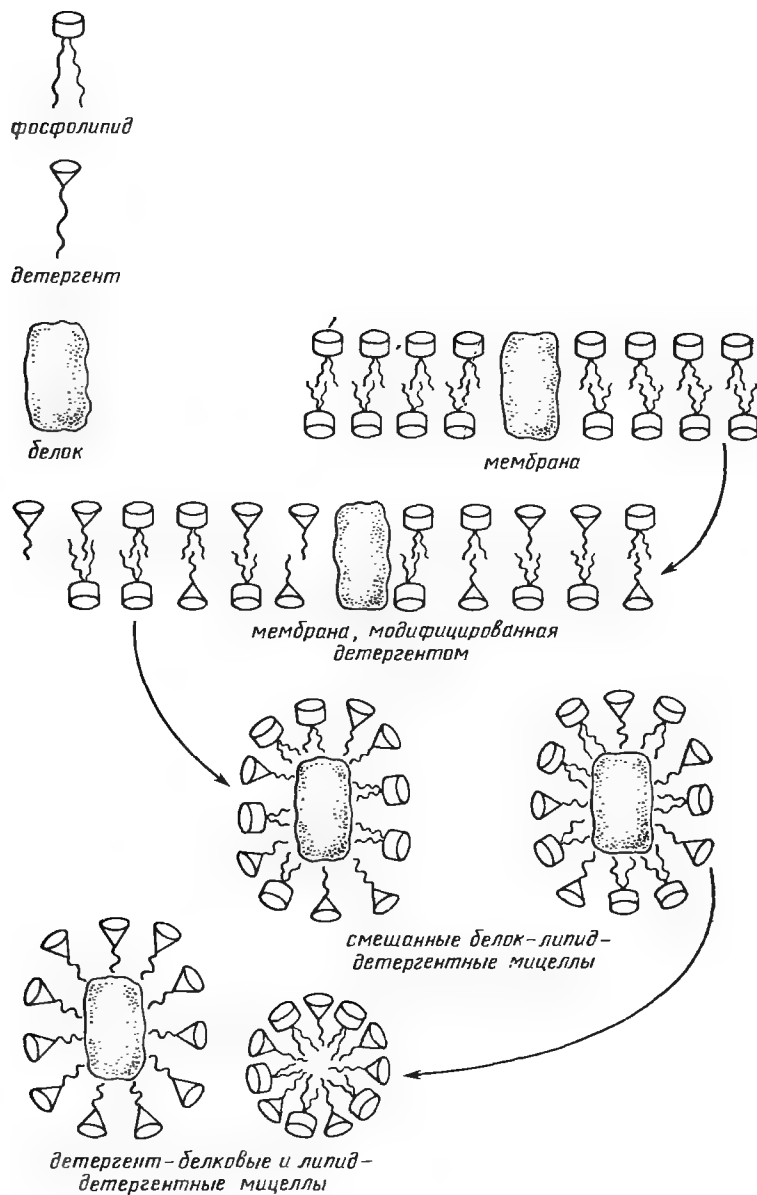


Рис. 35. Солюбилизация клеточных мембран детергентами

Одной из важных характеристик детергента является *критическая концентрация мицеллообразования* (ККМ), поскольку способ действия детергента на мембрану зависит от того, превышает используемая концентрация детергента эту величину или не достигает ее. В первом случае детергент полностью солюбилизирует мембранные структуры и включает компоненты мембран в собственные мицеллы, во втором — модифицирует мембрану, не разрушая полностью структуры бислоя. Величины критических концентраций мицеллообразования для некоторых детергентов при комнатной температуре представлены в табл. 14. При использовании фактических данных, однако, следует учитывать зависимость этой величины от температуры и ионной силы среды.

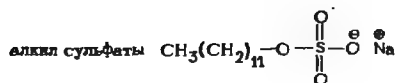
Таблица 14

Характеристика некоторых широко применяемых детергентов

Детергент	Агрегационное число	Мицеллярный вес*	ККМ, мМ
Группа А			
анионные			
децилсульфат натрия	50	14 000	33
додecilсульфат натрия	62	18 000	8,2
тетрадецилсульфат натрия	138	44 000	2,1
катионные			
децилтриметиламмоний бромид	48	13 000	65
тетрадецилтриметиламмоний бромид	64	19 000	4,5
цетилтриметиламмоний бромид	169	62 000	0,692
амфолитические			
яичный лецитин	181	92 000	0,92
неионные			
Тритон X=100	140	90 000	0,1—0,2
Группа В			
холат натрия	2—4	900—1800	13—15
дезоксихолат натрия	4—10	1700—4200	4—6
таурохолат натрия	4	2200	10—15

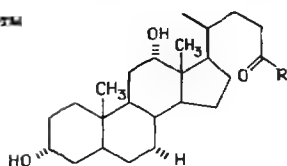
* Средние молекулярные размеры мицелл в дальтонах.

Важным показателем является также *агрегационное число* детергента: количество молекул, входящих в состав одной мицеллы. Из табл. 14 видно, что по этому показателю детергенты группы А сильно отличаются от детергентов группы В: первые образуют выраженные мицеллярные структуры, в то время как вторые способны лишь образовывать агрегаты из нескольких молекул. В соответствии с различиями в структуре, определяющими эти свойства, детергенты группы А способны не только внедряться в мембранный бислой, но и солюбилизовать его, образуя собственные мицеллы с встроенными в них мембранными белками. На рис. 35 приведена схема солюбилизации мембран детергентом группы А. Детергенты группы В, не способные образовывать собственные мицеллы, могут лишь встраиваться в мембранный бислой или в мицеллы, образованные детергентами группы А.



додецилсульфат натрия
(лаурилсульфат натрия)

желчные кислоты

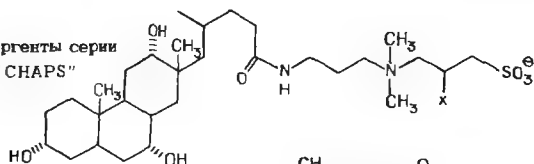


$\text{R} = \text{O}-\text{Na}^+$ дезоксихолат натрия

$\text{R} = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^--\text{Na}^+$ тауродезоксихолат натрия

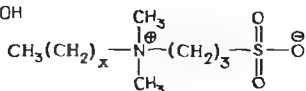
$\text{R} = \text{NHCH}_2\text{CH}_2-\text{Na}^+$ гликодезоксихолат натрия

детергенты серии
"CHAPS"



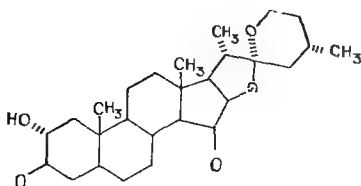
$\text{X} = \text{H}$, CHAPS
 $\text{X} = \text{OH}$, CHAPSO

бетаины

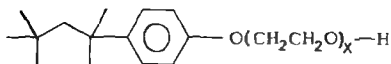


$\text{X} = 13$, Zwittergent 3-14
 $\text{X} = 7$, Zwittergent 3-08

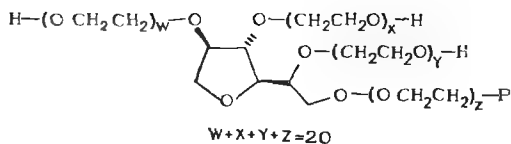
дигитонин



полиоксиэтилен-
ны (моно- и
полидисперсные)



$\text{X} = 9-10$, Тритон $\text{X} = 10\text{C}$
 $\text{X} = 7-8$, Тритон $\text{X} = 114$



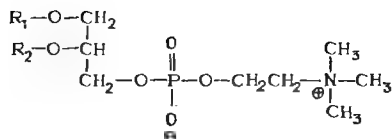
$\text{R} = \text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{CO}_2$ (лаурет).

Твин 20;

$\text{R} = \text{C}_{11}\text{H}_{33}\text{CO}_2$ (олеет),

Твин 80

лецитины и
лизолецитины



R_1 и R_2 — длинноцепочечные жирнокислотные радикалы, лецитины;
 R_1 — алильная цепь, R_2 — лизолецитины

Выше приведены формулы некоторых часто употребляемых детергентов различного механизма действия.

Чем следует руководствоваться, выбирая детергент для использования? Экстракцию периферических белков из мембранных фрагментов легко осуществить изменением рН, ионной силы или применением хелаторов двухвалентных катионов. После этого внеклеточные фрагменты полипептических белков можно отщепить протеолизом. Иногда для выделения мембраносвязанных белков используют органические растворители, если нет необходимости в получении белков в нативном состоянии. Для выделения комплексов белка с аннуляриными липидами используются *неионные детергенты*, в то время как при использовании *ионных детергентов* можно получить белок — детергентные комплексы.

В зависимости от свойств белковых молекул и характера ионных групп белка успешным будет применение *катионных* или *анионных детергентов*, причем для последних особенно важно, чтобы рН среды был выше, чем значение pK_a для данного детергента. Ряд детергентов плохо растворяется при низкой температуре, и их применение ограничено температурами, при которых может наблюдаться денатурация или агрегация белковых молекул. Температура, при которой проводится обработка мембранного материала, будет определять, в мицеллярной ли форме находится детергент (поскольку величина ККМ сильно зависит от температуры) и каковы размеры его мицелл.

Действительно, растворимость детергентов сильно зависит от условий среды. Так, 2% Zwittergent 3-14 хорошо растворим в воде при комнатной температуре и практически нерастворим при 4°C. Гликодезоксихолат натрия имеет агрегационное число около 2 в воде и 20 — в 0,15 M NaCl.

Удаление детергента из материала после растворения мембран представляет собой сложную задачу. Однако, если такая цель поставлена, следует выбирать для этих экспериментов детергенты с высокими (выше 1 мМ) значениями ККМ.

Модифицируя упаковку белка, детергенты влияют на его спектральные характеристики. Сами детергенты также, как правило, являются оптически активными веществами. Детергенты серии *Тритона* обладают ароматическими группами, поглощающими в ультрафиолетовой области спектра. Поэтому в опытах, которые сопровождаются измерениями в этих частях спектра, лучше использовать аналоги Тритона с восстановленной структурой (*гидрогенизованные Тритоны*), обладающей аналогичными детергентными свойствами, но не поглощающей в УФ-области. Многие детергенты имеют флуоресцирующие группировки, что также следует учитывать при планировании экспериментов.

Детергенты могут быть источниками разнообразных артефактов, взаимодействуя с белковыми красителями, фиксирующими смесями, могут обеспечивать структурные артефакты при электронно-микроскопических исследованиях мембранных фрагментов.

Использование детергентов при гель-фильтрации мембранных белков дает лучшие результаты, если применяют детергенты с агрегационным числом менее 30. В этом случае достигается лучшее различие белоксодержащих и безбелковых мицелл.

Как бы умело ни были подобраны условия обработки мембранных белков детергентами, последние всегда в той или иной мере денатурируют белковые структуры. Однако наиболее губительным действием обладают детергенты, в состав которых входят длинноцепочечные неразветвленные жирнокислотные цепи, по-видимому, предоставляющие слишком много возможностей для повреждающего действия разнообразных факторов. Зачастую эти повреждения являются обратимыми, и функциональную активность белка можно полностью или частично восстановить после удаления детергента при замене его на природные липиды или их смеси. Это наблюдение верно даже для такого сильного модификатора мембранных структур, каким является додецилсульфат натрия.

По этой причине понятно стремление исследователей использовать минимальные концентрации детергентов. Соотношение концентраций детергент : белок должно подбираться экспериментально для каждого случая. При этом для разных систем это соотношение колеблется от 10 : 1 до 0,1 : 1 мг/мг.

ВОПРОСЫ

1. Дайте определение детергентов, приведите их классификацию.
2. Какие параметры используются для характеристики детергентов?
3. Известны ли Вам природные детергенты, каковы их функции?
4. Как детергенты действуют на мембранные системы?
5. Принципы выбора детергента для проведения исследований.

II.5. ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ С МЕМБРАННЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

Скорость ферментативных реакций существенно зависит от pH среды. Эта зависимость могла бы использоваться при регуляции метаболизма, если бы в клетке не присутствовали буферные системы — белки и слабые кислоты типа бикарбоната или фосфатионов. Экспериментаторы также стараются проводить опыты в условиях постоянства pH, используя для этого буферные растворы.

Проблема выбора буфера заключается в том, что природные буферы трудно использовать в эксперименте: альбумин — из-за опасности белковой ошибки при определении pH; фосфат является участником или продуктом многих протекающих реакций. По этой причине получил распространение синтетический буфер *трис-гид-*

роксиметиламинометан. Он обладает высокой буферной емкостью при pH 7—8 (pK 8, 13), мало токсичен, не образует комплексов с ионами металлов, может быть легко очищен от примесей. Однако существуют серьезные препятствия для использования этого буфера. Он оказывает выраженное побочное влияние на транспортные системы: природные переносчики анионов в плазматических мембранах способны транспортировать молекулы триса, создавая потенциал на поверхности бислоя. Кроме того, pK трис-буфера сильно зависит от температуры (при сдвиге температуры от 5 до 40°C pH раствора понижается на 1 ед.) и его активной концентрации (pH буфера при концентрациях 0,01; 0,05 и 0,1 М составляет n , $n+0,05$ и $n+0,1$ ед. pH соответственно). Недавно обнаружена способность триса реагировать с компонентами pH-электродов, вызывающая искажения в значениях pH.

Имидазол (pK 7,0) лишен этих недостатков, его pH почти не меняется с температурой ($\Delta \text{pH}/^\circ\text{C}=0,01$), но сам он может проявлять биологическую активность, например как активатор фосфодиэстеразы цАМФ или Na,K-АТФазы. *Гистидин* (pK 6,0) недостаточно сильный буфер в области pH 7—8, кроме того, он связывает ионы Ca, Cu, Fe и др.

В настоящее время в практике экспериментальных работ широко используют синтетические буферы со значениями pK в области нейтральных значений pH — MES, PIPES, HEPES и др. Для того чтобы обезопасить себя от возможных ошибок, связанных с неудачным выбором буфера, следует сравнивать результаты экспериментов, полученные в разных буферных средах.

Т а б л и ц а 15

Логарифмы констант связывания комплексоном и некоторых металлов в стандартных условиях

Ионы	Этилендиамин-тетраацетат, ЭДТА	Этиленгликольтетраацетат, ЭГТА	Диаминцикло-гексатетраацетат, ЦДТА
Mg ²⁺	8,7	5,2	11,0
Ca ²⁺	10,7	11,0	13,2
Cu ²⁺	18,8	17,8	21,3
Fe ²⁺	14,3	?	?
Pb ²⁺	18,3	?	19,7
Sr ²⁺	8,6	8,5	10,5
Zn ²⁺	16,3	14,5	18,7

Для связывания ионов Ca или Mg в среду инкубации часто добавляют специфические комплексоны, обладающие высоким сродством к этим ионам (табл. 15). Однако при нейтральных и слабощелочных pH комплексоны активно взаимодействуют и с мембранным бислоем, модифицируя его структуру, индуцируя диссоциацию от бислоя периферических белков (которые могут быть

регуляторами мембранных ферментов) и модифицируя сами белки. В частности, все комплексоны, приведенные в табл. 15, в два раза и более активируют мембранную Na, K-ATФазу путем, не связанным с устранением из среды ионов тяжелых металлов.

В опытах часто используют фрагменты клеток или клеточные органеллы с замкнутыми мембранами. Доступность субстратов и активаторов к активным центрам белков в таких структурах ограничена и может варьировать под влиянием различных факторов. По этой причине экспериментатор может получать разные значения удельной активности того или иного фермента в зависимости от условий эксперимента. Однако эти различия не будут служить объективной характеристикой исследуемой системы. К объяснению результатов привлекают понятие так называемой *латентной активности* мембранных ферментов.

В результате маскировки части активных центров мембранных белков в замкнутых структурах ферментативная реакция протекает нелинейно во времени даже при использовании малых количеств белка, при которых не наблюдается его агрегации. В этих ситуациях для нарушения мембранных структур применяют детергенты. Однако даже те из них, которые являются достаточно мягкими (*сапонин, дигитонин, тритон X-100, луброл*), могут повреждать липидное окружение фермента и модифицировать (инактивировать) фермент. В этих случаях целесообразно использовать ионофоры, способные индуцировать специфическую (валиномицин для калия, *A23187* или *X-537A* для кальция) или неспецифическую (*аламетицин*) проницаемость мембранных структур.

Мембранные белки являются конформационно лабильными структурами. Конформационное состояние белков изучают, оценивая доступность тиоловым реагентам SH-групп белка в разных условиях. Одно из эффективных соединений — 2-хлор-4-нитробензо-2-окса-1,3-диазол — НБД-хлорид (НБД-Cl). Это вещество способно также взаимодействовать с NH_2 -группой лизина, OH-группой тирозина или SH-группой цистеина, причем интенсивность взаимодействия с разными группами зависит от условий проведения эксперимента.

Интересные результаты получены при исследовании взаимодействия НБД-Cl с $\text{Ca-ATФазой саркоплазматического ретикулума}$, обеспечивающей активный транспорт Ca^{2+} (Рубцов, 1982). Это взаимодействие осуществляется достаточно медленно, поэтому за процессом можно следить непрерывно.

По скорости модификации SH-группы Ca-ATФазы делятся на медленно и быстро реагирующие (малореакционноспособные и высокореакционноспособные). Только вторые имеют отношение к проявлению ферментативной активности: ингибирование фермента НБД-Cl осуществляется по мере их связывания. АТФ обеспечивает уменьшение скорости взаимодействия SH-групп с НБД-Cl и переводит их из «быстрого» типа реагирования в «медленный». При низких концентрациях АТФ защищает одну SH-группу фермента, при повышении концентрации лиганда выявляется защит-

ное действие еще на одну группу. Тем же «защитным» эффектом обладает АДФ.

Значения K_d для АТФ, рассчитанные из величины защитного эффекта, соответствуют величинам K_m для этого субстрата. K_d для АДФ имеет сходную величину. В ходе этих экспериментов обнаружилась определенная связь между скоростями модификации SH-групп фермента НБД-Cl и ингибированием его активности: ингибирование фермента протекает в четыре раза быстрее модификации его SH-групп, из чего следует, что модификация SH-групп одной молекулы белка способна «выключить» из работы четыре молекулы фермента. Этот факт отражает *олигомерную природу* Ca-АТФазы. АТФ, замедляя модификацию SH-групп НБД-Cl, одновременно уравнивал константы инактивации и модификации фермента так, что они составляли в его присутствии величины одного порядка. Это позволяет полагать, что АТФ нарушает взаимодействие молекул в олигомерном ансамбле. В его присутствии из работы выводятся ровно то количество молекул фермента, которое было модифицировано реагентом.

Высокая информативность исследований температурной зависимости функций биологических структур, теоретическое обоснование которых сконцентрировано в уравнениях Вант-Гоффа и Аррениуса, неоднократно побуждала ученых использовать этот подход. Исследование изменений энтальпии и энтропии отдельных стадий ферментативного цикла в широком интервале температур может многое дать для понимания молекулярных механизмов реакции.

Однако при проведении таких экспериментов в трактовке получаемых результатов следует соблюдать известную осторожность. Необходимо исключить температурный сдвиг рН буфера, влияние температуры на величины констант диссоциации комплексов субстрата с ионами-активаторами (например, Mg-АТФ) или комплексона с ионом, концентрацию которого он должен стабилизировать (оксалат Ca или Mg-ЦДТА и т. д.), и, наконец, наличие критических температур для физико-химического состояния бислоя, его гидрофобный объем, легкость образования мицелл (например, в присутствии детергентов) и тем самым доступность субстрата или ионов-активаторов гидролитическим и эффекторным центрам в белково-липидных комплексах мембранных ферментов (Блюменфельд, 1977).

Основной (эмпирический) показатель применимости уравнения Аррениуса для изучения конкретного процесса — линейность его температурной зависимости в координатах Аррениуса при достаточно малом угле наклона с $Q_{10} \sim 2-4$ (температурный коэффициент Q_{10} определяется, как соотношение скоростей реакции при двух температурах, различающихся на 10°C). Для контроля линейности зависимости рассчитывают Q_{10} для разных интервалов температур ($10-20$, $15-25$, $30-40^\circ$ и т. д.). В случае линейной зависимости величины Q_{10} должны совпадать.

Однако более строго уравнение Аррениуса выглядит так:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{E_a}{RT^2} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} + \frac{1}{T} = \frac{\Delta H^0 + RT}{RT^2},$$

откуда энергия активации процесса (E_0) равна не ΔH^0 , а $\Delta H^0 + RT$, т. е. величина E_a сама зависит от температуры, уменьшаясь с удалением от 0°C температурного интервала, выбранного для исследования. Эта причина сама по себе должна вызывать искривление графика Аррениуса, хотя и на малую величину (порядка нескольких кДж/моль).

Другая, более существенная причина того, что исследователи слишком часто встречаются с нелинейностью зависимостей биологических функций в координатах Аррениуса, — неправомерная замена измеряемых параметров. Так, при исследовании ферментативных реакций константу скорости ферментативного процесса следовало бы находить из уравнения

$$V_0 = k_{+2}[ES],$$

проводя реакцию в условиях насыщения фермента субстратом и лигандами. Однако это требует большого объема экспериментальной работы. В то же время значение k_{+2} должно быть пропорционально значению $V_{\max}$, и можно заменить k_{+2} на $V_{\max}$. Однако замена $V_{\max}$ на v_0 неправомерна, поскольку последняя величина хотя и легко измеряется экспериментально, но не эквивалентна значению $V_{\max}$. Более того, разница между $V_{\max}$ и v_0 даже при оптимальных условиях реакции будет различной при разных температурах.

При использовании для построения графиков Аррениуса значения начальной скорости измеряемых ферментативных реакций можно анализировать лишь вид графика Аррениуса (линеен — нелинеен, какова область критических температур и т. д.), но не абсолютные значения энергии активации. В ряде случаев, например при термоденатурации белка в ходе опыта, и этот анализ провести невозможно. Критерием правильности результата может служить его независимость от времени инкубации и преинкубации, количества белка в пробе, порядка добавок и других условий. Распространенной ошибкой является предположение, что нелинейность графика Аррениуса для функции какого-либо мембранного белка непременно отражает фазовые переходы мембранных липидов. Поэтому не следует рассчитывать значение $T_{\text{кр}}$ из таких зависимостей. Как видно из приведенных рассуждений, интерпретация этой зависимости далеко не так однозначна. Более того, она может быть связана не только с ошибками эксперимента. Наиболее частыми причинами кроме самого фазового перехода (или фазового разделения) мембранных липидов могут быть:

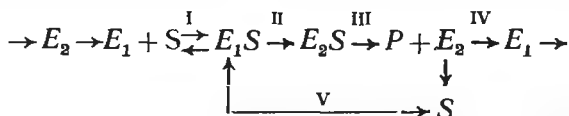
- 1) наличие двух параллельных реакций, протекающих на двух разных активных центрах (одного или нескольких ферментов) и имеющих разные энергии активации;
- 2) смена лимитирующей стадии реакции с температурой;

- 3) наличие двух изоформ фермента с различными энергиями активации, находящихся в температурно-зависимом равновесии друг с другом;
- 4) равновесие между активной и неактивной формами одного и того же фермента.

Все эти факторы затрудняют получение однозначной информации из исследования температурной зависимости мембранных ферментов.

В целом ряде случаев мембранные ферменты обнаруживают отклонения от гиперболической кинетики, описываемой уравнением Михаэлиса—Ментен. Для объяснения этого феномена создаются оригинальные концепции: о существовании специального регуляторного центра с низким сродством к субстрату, обеспечивающего аллостерическую регуляцию активности; исходную или индуцируемую гетерогенность активных центров фермента в олигомерных ансамблях; изменение конформации белковых молекул вследствие фазовых переходов мембранных липидов и т. п.

К. Фердинанд в 1979 г. предложил кинетическую схему, предусматривающую существование стадии, на которой взаимодействие с субстратом индуцирует медленное изменение конформации фермента, аналогичное *гистерезисному*. Согласно Фердинанду, простейшая ферментативная реакция такого типа должна включать дополнительную стадию — медленную *релаксацию фермента* в исходное состояние (*R*) из того конформационно-напряженного состояния (*T*), в котором он оказался в ходе ферментативного процесса (переход из E_2 в E_1):



В рамках модели Фердинанда присоединение субстрата к активному центру протекает как равновесная стадия, конформационный переход сравним по скорости с максимальной скоростью реакции, и увеличение концентрации субстрата сдвигает равновесие между двумя конформациями фермента. Поэтому повышение концентрации *S* заменяет стадию I стадией V. Такое объяснение «не-Михаэлисовой кинетики» мембранных ферментов правомочно в целом ряде случаев.

Однако часто эти отклонения от кинетики Михаэлиса—Ментен являются следствием ошибочной постановки эксперимента.

Наиболее частыми ошибками, приводящими к отклонению субстратной зависимости ферментативной активности от гиперболического вида, являются следующие.

1. Неоптимальная концентрация лигандов (случай описан для анионной АТФазы секреторной ткани). Если концентрация АТФ возрастает на фоне высокой концентрации ионов Mg , обнаружи-

вается отклонение субстратной зависимости от гиперболической, так как увеличение концентрации АТФ снимает ингибирование реакции избытком ионов Mg.

2. Полимеризация фермента или агрегация белково-липидного материала, обеспечивающие зависимость кинетического поведения фермента от разведения белка или способа инициирования реакции (добавление белка или субстрата). Повышение ионной силы, как это описано для щелочной фосфатазы, может упростить вид кинетики.

3. Лимитирование реакции медленной скоростью диссоциации лигандов в среду от соответствующих центров связывания в условиях недостатка лигандов или затруднений для их проникновения к этим центрам в везикулах мембранного материала.

4. Наличие в мембранном материале белков, модифицирующих изучаемую активность (описано для Са-АТФазы эритроцитов, имеющей сложную кинетику гидролиза АТФ в присутствии кальмодулина, но простую кинетику после его экстракции).

Чтобы избежать ошибок такого рода, следует не ограничиваться исследованием удельной активности, а изучать непосредственно константы ферментативных реакций.

ВОПРОСЫ

1. Особенности буферов, используемых в опытах с мембранными ферментами.
2. Каким методом можно оценить конформационную лабильность мембранных белков?
3. Ограничения в исследовании температурной зависимости мембранных ферментов.
4. Причины отклонения мембранных ферментов от кинетики Михаэлиса.
5. Принципы релаксационной кинетики.

Глава III. ТРАНСПОРТ ЧЕРЕЗ БИОМЕМБРАНЫ

III.1. ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПОРТНЫХ ПРОЦЕССОВ

Одна из существенных функций биологических мембран — обеспечение избирательной проницаемости для веществ, транспортируемых в процессе жизнедеятельности клетки в среду и из среды в клетку. Отдельные части живой системы, разделенные мембраной, функционируют как открытые системы.

Молекулы транспортируемых веществ или ионы металлов могут переноситься через мембрану независимо от наличия и переноса других соединений — *унипорт*, их перенос может осуществляться одновременно и однонаправленно с другими соединениями — *симпорт*, и, наконец, транспорт соединений может быть обусловлен одновременным и противоположно направленным транспортом другого соединения — *антипорт*. Симпорт и антипорт представляют собой виды *котранспорта*, при которых скорость суммарного процесса контролируется наличием и доступностью для систем переноса обоих партнеров транспортного процесса (рис. 36).

Роль мембран в транспортной функции заключается в сопряжении и регуляции потоков энергии, вызывающих и сопровождающих процессы транспорта. Если транспорт сопровождается уменьшением свободной энергии, он протекает самопроизвольно и называется пассивным. Перенос веществ через мембрану, связанный с увеличением парциальной свободной энергии, называется активным. Различие видов переноса иллюстрирует рис. 37.

Неспецифическая диффузия осуществляется, не требуя специальных механизмов: вещества проникают через мембрану благодаря наличию кинков или в области мембранных дефектов. Пассивный и активный транспорт обеспечивается специальными структурами. В их числе *каналы*, *переносчики*, *ферменты*, обеспечивающие перемещение специфических ионов против их концентрационного градиента за счет энергии АТФ.

Канальный и переносчиковый типы транспорта легко различить по концентрационной зависимости скорости

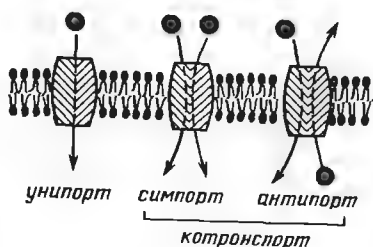


Рис. 36. Классификация способов переноса через мембрану

транспортного процесса: первый имеет линейную зависимость, а второй характеризуется кинетикой насыщения (рис. 38).

Как пассивный, так и активный транспорт в общем виде подчиняется кинетике насыщения. Разница заключается лишь в том,

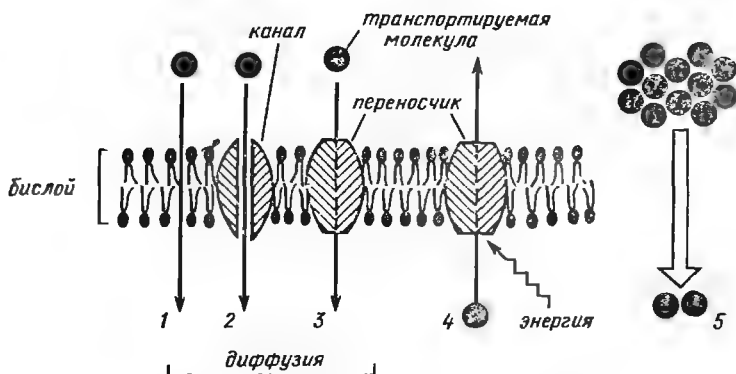


Рис. 37. Виды пассивного и активного транспорта веществ через мембрану: 1, 2 — простая диффузия через бислой и канальную структуру, 3 — облегченная диффузия, 4 — первично-активный транспорт, 5 — вторично-активный транспорт

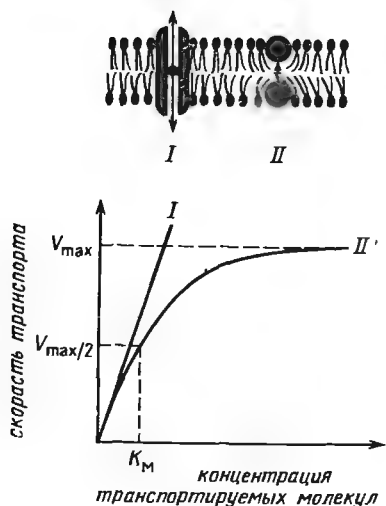


Рис. 38. Зависимость скорости транспорта от концентрации молекул при канальном (I) и переносчиковом (II) механизме. А — схема, Б — кинетическая зависимость

что в случае активного транспорта существует дополнительная стадия, сопряженная с затратами энергии. В случае *ионного транспорта*, осуществляемого транспортными АТФ-азами (их называют также ионными насосами), энергодающей стадией является гидролиз АТФ. Такой процесс называется «*первично-активным транспортом*». Если же энергия обусловлена градиентом ионов, созданным независимо, например в процессе первично-активного транспорта, этот процесс называется «*вторично-активным транспортом*».

Вторично-активный транспорт обеспечивает перенос в клетку аминокислот и моносахаридов, поступающих за счет энергии, обусловленной градиентом ионов, чаще всего Na^+ . В клетках низших эукариот кроме градиента Na^+ для этой цели может использоваться

градиент протонов, у некоторых грибов его создают высокомолекулярные полифосфаты. Перенос осуществляется с помощью белков-переносчиков, имеющих молекулярную массу 25—40 КДа. Некоторые переносчики выделены из плазматических мембран слизистой кишечника, эритроцитов, бактерий. Они имеют самое разное сродство (K_d для переносимых веществ варьирует от 10^{-7} до 10^{-4} моль/л) и специфичность. Известны случаи переноса одной и той же аминокислоты тремя-четырьмя разными переносчиками или, наоборот, специфичность одного переносчика к двум-трем разным соединениям.

Ко вторично-активному транспорту относятся и процессы переноса, сопряженные с ферментативной модификацией переносимых соединений. Например, фосфотрансферазная система бактерий, отсутствующая у эукариот, фосфорилирует сахара в процессе их проникновения через мембрану, вовлекая их тем самым в клеточный метаболизм. У грамотрицательных бактерий так переносятся D-глюкоза, D-фруктоза и D-глюкозамин. У грамположительных бактерий набор переносимых веществ шире: сюда относятся также пентозы, сахароза, трегалоза, лактоза, глицерин. При этом лактоза и фруктоза фосфорилируются по C_1 , остальные вещества — по концевому углероду.

Кроме этих видов переноса в особую группу выделяют специальные механизмы перемещения веществ, связанные с нарушением структурной целостности мембраны (эндо- и экзоцитоз). К ним относится высвобождение медиаторов в синапсах при возбуждении, перенос генетического материала через ядерную мембрану, деятельность бактериальных пермеаз, обеспечивающих перемещение олигопептидов через клеточную стенку.

Из краткой характеристики видно, что процессы первично-активного транспорта в регуляции клеточных функций занимают ведущее место. В результате работы систем первично-активного транспорта в клетке создается и поддерживается ионный состав, резко отличающий ее от окружающей среды.

Все виды ионного транспорта через клеточные мембраны подразделяются на 4 группы: *пассивная диффузия*, *облегченная диффузия*, *первично-активный транспорт* и *вторично-активный транспорт*.

Величина пассивной диффузии так незначительна, что она может быть опущена из рассмотрения.

Однако транспорт ионов через разнообразные канальные структуры в период, когда они открыты, также происходит по принципу пассивной диффузии (т. е. в направлении электрохимического градиента) и имеет большое влияние на потенциал клетки. Ионные каналы делятся на потенциал-зависимые и индифферентные.

Все потенциал-зависимые каналы устроены, по-видимому, одинаково. Интегральный белок канальной структуры образует пору в мембране, кроме нее имеется селективный фильтр, обеспечиваю-

щий специфичность канала, а также сенсор мембранного потенциала — устройство, управляющее состоянием канала в зависимости от знака и величины потенциала. Известны каналы, обеспечивающие проводимость мембраны для Na^+ , K^+ и Ca^{2+} . Первые активируются *вератридином*, *грайанотоксином*, *батрахотоксином*. Действие этих соединений, как и эффект электрического потенциала, устраняется *тетродотоксином*. К-каналы блокируют *тетраэтиламмонием* и его производными. Известны также Са-зависимые К-каналы, открывающиеся при существенном возрастании концентрации внутриклеточного Ca^{2+} .

Са-каналы также бывают потенциал-зависимыми и потенциал-индифферентными. Последние чувствительны к целому ряду разнообразных химических веществ, носящих название Са-антагонистов (*верапамил*, *дилтиазем*, *нифедипин* и другие производные дигидропиридинов и т. д.). Известны и агонисты Са-каналов. Открывание этих каналов осуществляется в присутствии адениновых нуклеотидов и следовых количеств Ca^{2+} . Чувствительность химически управляемых Са-каналов к цАМФ и протеинкиназам объясняется тем, что фосфорилирование регуляторных компонентов канала контролирует длительность его нахождения в открытом состоянии.

Облегченная диффузия протекает при участии специальных белковых молекул-переносчиков. Данные о структурной организации систем, обеспечивающих облегченную диффузию, в настоящее время отсутствуют; для выявления этих структур стараются использовать специфические ингибиторы.

Трансмембранный обмен (антипорт) или одноподнаправленный транспорт (симпорт) рассматриваемых ионов осуществляют специфические переносчики. В эритроцитах примерами таких систем являются Na/Na -обмен, анионный обмен, в гладкомышечных клетках и клетках сердца — Na/Ca -обмен (рис. 39). Обменный транспорт Na^+ ингибируется *флоретином*, транспорт хлора, осуществляемый белком полосы 3, — производными *стильбендисульфоновой кислоты*. Поскольку проницаемость мембраны для Cl^- не зависит от потенциала, можно полагать, что его транспорт осуществляется электронеутрально — в обмен на другой анион (чаще всего бикарбонат).

Система одноподнаправленного транспорта (*котранспорта*) представлена ($\text{Na}^+ + \text{K}^+ + 2\text{Cl}^-$)-переносом, чувствительным к диуретикам (*фуросемид*).

Первично-активный транспорт также осуществляется с помощью специфических переносчиков, но, в отличие от облегченной диффузии, — против концентрационного градиента переносимых ионов. Поэтому противогradientный транспорт ионов осуществляется за счет энергии гидролиза АТФ. Перенос осуществляется *транспортными АТФазами*, называемыми также *ионными насосами*. Наиболее распространена в клетке животных Na, K -АТФаза — интегральный белок плазматической мембраны и Са-АТФаза, встречающаяся как в плазматической, так и во внутриклеточ-

ной мембране (см. рис. 39). Все три белка представляют собой различные ферментные системы, которые объединяет общий принцип функционирования (см. III.3.1).

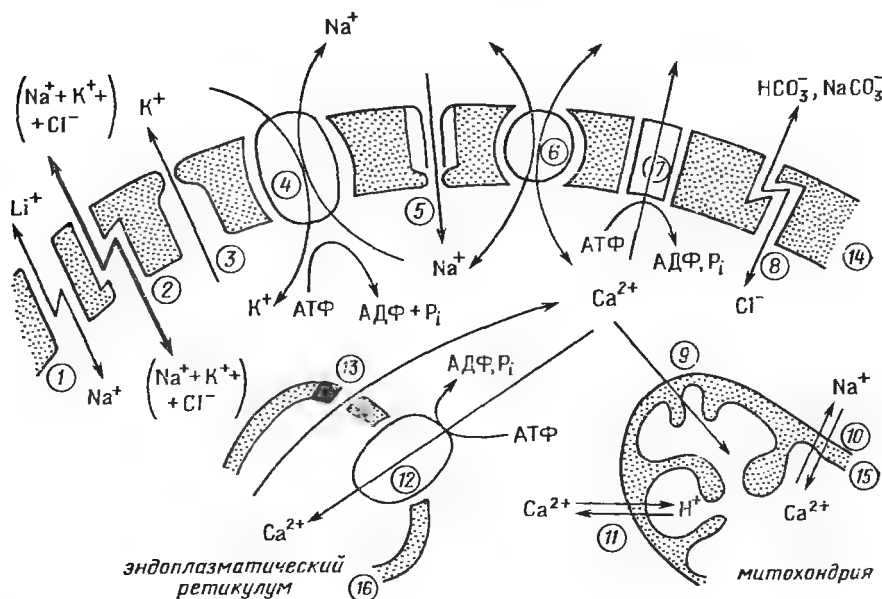


Рис. 39. Виды транспорта ионов через клеточные мембраны. 1 — Na/Li-обмен; 2 — $(\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Cl}^-)$ -симпорт; 3 — выход калия через K-каналы; 4 — Na, K-АТФаза; 5 — вход натрия через Na-каналы; 6 — Na/Ca-обмен; 7 — Ca-насос плазматических мембран; 8 — $\text{HCO}_3^- (\text{NaCO}_3) / \text{Cl}^-$ -антипорт; 9 — транспорт кальция в митохондрии; 10 — Na/Ca-обмен через митохондриальную мембрану; 11 — Ca/H-обмен через митохондриальную мембрану; 12 — Ca-насос саркоплазматического ретикулума; 13 — Ca-каналы саркоплазматического ретикулума; 14 — плазматическая мембрана; 15 — митохондриальная мембрана; 16 — мембрана саркоплазматического ретикулума

Митохондрии — это пример системы, осуществляющей вторично-активный транспорт Ca^{2+} . В этом случае перенос иона осуществляется по градиенту потенциала, образованного на мембране за счет метаболических процессов, например дыхания или гидролиза АТФ. При этом на мембране генерируется потенциал, и транспорт Ca^{2+} осуществляется по принципу электрофореза.

Мембранный потенциал, возникающий в ходе работы ионных систем, как и других систем, рассматриваемых ниже, например электрон-транспортной цепи (см. разд. IV.3), используемый клеткой на разнообразные нужды. Он стабилизирует мембрану, управляет работой мембранных белков, контролирует межклеточные взаимодействия. Ионные градиенты всей совокупностью процессов

ионного переноса определяет возбудимость клеток, длительность клеточного цикла, характер клеточного метаболизма. Наличие ионного градиента определяет жизнеспособность клетки.

ВОПРОСЫ

1. Классификация транспортных процессов.
2. Различия первично-активного и вторично-активного транспорта.
3. Каким способом можно различить канальный и переносчиковый механизмы транспорта?
4. Назовите специфические ингибиторы ион-транспортирующих систем.
5. Дайте определение транспортных АТФаз.

III.2. ИОННЫЙ ГОМЕОСТАЗ КЛЕТКИ

Среди неорганических компонентов, в той или иной степени участвующих в метаболизме клеток и тканей, первое по важности место принадлежит ионам металлов. Накапливаемые клетками в определенных соотношениях или выбрасываемые из клеток в окружающую среду ионы металлов играют роль специфических регуляторов ферментных систем. В табл. 16 дана краткая характеристика жизненно важных металлов, участвующих в обмене веществ.

Для всех перечисленных элементов, по-видимому, существуют способы, благодаря которым клетки регулируют их содержание. Для некоторых элементов системы аккумуляции или выброса из клетки так мощны, что обнаруживается яркая неравномерность в распределении ионов по обе стороны клеточной мембраны (табл. 17). Так, клетки всех тканей животных характеризуются электрохимическим градиентом ионов Na, K и Ca. Ионы Na выбрасываются из клетки, а ионы K накапливаются там; ионы Ca способны как выбрасываться из клеток, так и аккумулироваться во внутриклеточных депо, благодаря чему концентрация ионизированного Ca^{2+} в «покоящейся» клетке составляет $\sim 10^{-7}$ моль/л.

Натрий и калий. Причина, по которой живые системы «выбрали» одновалентные ионы для создания ионной асимметрии, проста: это наиболее распространенные ионы в неживой природе. Кроме того, эти ионы отличаются важными особенностями. Оба указанных элемента имеют низкий *потенциал ионизации внешнего электрона* (так называемый первый потенциал ионизации), а образующийся ион обладает конфигурацией атома инертного газа, т. е. является сферическим и слабо поляризуемым.

Второй потенциал ионизации для этих элементов достаточно высок. По этой причине трудно предположить существование других окисленных форм этих металлов; в действительности они неизвестны.

В биологических жидкостях натрий и калий представлены преимущественно в ионной форме. В водной фазе рассматриваемые

Основные свойства жизненно важных элементов

Наименование элемента	Химическая характеристика	Биохимическая роль
Na и K	высокоподвижные одновалентные катионы, образующие различные растворимые соли, а также слабые комплексы с лигандами (за исключением циклических полидентов типа валиномицина или мононзина)	концентрационные градиенты Na^+ и K^+ , создаваемые за счет активного транспорта, обеспечивают клетке осмотический и электрохимический потенциалы; оба иона являются также промоторами структуры нуклеиновых кислот и белков; этим же путем K^+ специфически активирует ряд ферментов
Mg, Ca, Zn	Mg^{2+} и Ca^{2+} легко связываются с анионными лигандами типа фосфата; Zn^{2+} охотнее взаимодействует с донорами азота и серы, особенно с гистидином и цистеином	являются активаторами различных ферментов, а также промоторами структуры белков, но не участвуют в окислительно-восстановительных процессах Mg^{2+} представляет собой интегральную часть молекулы хлорофилла, фотосинтетического фермента растений и фотосинтезирующих бактерий; нерастворимые соли и комплексы Ca^{2+} — основа формирующегося скелета животных, Ca^{2+} — агент, запускающий сокращение мышечных клеток и участник процессов возбуждения; для целого ряда белков, имеющих специфические центры связывания, Ca^{2+} — индуктор конформационного сигнала
V	наиболее важны поливанадаты (аналогичные полифосфатам), а также система ванадатов (V_4^{3-}) — ванадил (VO^{2+})	аккумулируется специальными клетками асцидий и некоторых червей (ванадоцитами); функция ванадоцитов неизвестна; у животных ванадий участвует в биосинтезе холестерина, пара ванадат — ванадил регулирует активность ряда ферментов, в том числе аденозинтрифосфатаз
Cr	Cr^{3+} является сильным окислителем	участвует в метаболизме глюкозы у млекопитающих
Mo	конгенер хрома, но с определенными отличиями; имеет высокое сродство к лигандам, связывающим электроны	точная функция Mo еще не ясна, но известно, что он важен для жизнедеятельности азотфиксирующих организмов, является кофактором нитрогеназы

вещества бурно ионизируются с восстановлением водорода воды, а образующиеся ионы легко гидратируются.

Натрий и калий входят в состав I группы элементов таблицы Менделеева вместе с H, Li, Rb, Cs, Fr. Все они (кроме газообразного водорода) — металлы и относятся к группе щелочных металлов. Общим для них является наличие избыточного (сверх конфигурации инертных газов) S-электрона.

Несмотря на высокую подвижность Na^+ и K^+ , они не распределены в живых системах равномерно. Напротив, как уже отмеча-

Содержание ионов в тканях и жидкостях тела животных
и в морской воде (ммоль/л)

Объект	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻
Крыса					
плазма крови	145	6,2	3,1	1,6	116
мышца	27	101	1,5	11	16
Лягушка					
плазма крови	104	2,5	2,0	1,2	74
мышца	24	85	2,5	11,3	10
Беззубка					
плазма крови	15	0,4	5,3	0,4	10
мышца	5	10,5	5,4	2,5	10
Осьминог					
плазма крови	525	12,2	11,6	57,2	480
мышца	81	101	3,7	12,7	93
Голотурия					
жидкость тела	460	11,8	10,7	50	523
мышца	191	139	89	39	277
Морская вода	440	9,5	0,4	1,3	535

лось, существует определенная избирательность в распределении этих ионов между клетками и внеклеточной средой (см. табл. 17).

Натрий в интерстициальной жидкости регулирует осмотический баланс организма и содержание воды в тканях. Ионы Na участвуют также в поддержании кислотно-щелочного равновесия в организме, а в возбудимых тканях (нервная и мышечная) участвуют в формировании электрического потенциала.

В последнее время установлены и другие важные для организма функции Na⁺, направленные на изменение упаковки нуклеиновых кислот и белков, поскольку связывание натрия ионными центрами макромолекул может стабилизировать их в определенных конформациях. Способность K⁺ стабилизировать структуру макромолекул резко отличается от таковой у Na⁺.

Калий также необходим для растений и животных. Поскольку многие его функции аналогичны таковым у Na⁺, эти ионы до некоторой степени взаимозаменяемы. Однако в большинстве случаев действие K⁺ оказывается противоположным действию Na⁺. Так, при возбуждении Na⁺ обеспечивает фазу деполяризации клетки, а K⁺ восстанавливает исходный потенциал на мембране. Для ряда ферментов гликолиза K⁺ является активатором, в то время как Na⁺ ингибирует их. По-разному влияют эти ионы и на конформационное состояние макромолекул. В основе их действия, видимо, лежит множественное связывание с анионными центрами крупных молекул, так как оптимальные активирующие концентрации одновалентных катионов очень высоки, они составляют 50—100 ммоль/л.

Результаты многих экспериментов показывают, что молекулы белков или нуклеиновых кислот могут «различать» Na⁺ и K⁺, не-

смотря на большое сходство между ними. Механизм этого явления пока остается неясным. Предполагают, что оно основано на различиях величины заряда и энергии гидратации этих ионов. Везикулы, приготовленные из природных фосфолипидов (например, фосфатидилсерина), способны создавать на своей мембране пяти-семикратный градиент K^+ и Na^+ за счет различной проницаемости для этих ионов. Чем объяснить эти различия в проницаемости? Вероятно, различиями в связывании с переносящими ионы группами.

Магний и кальций. Ионы Mg и Ca входят в состав II группы элементов таблицы Менделеева; эта группа открывается бериллием (Be). Бериллий обладает совершенно особыми свойствами, обусловленными малым металлическим радиусом (0,089 нм) и потенциалами ионизации (9,32 и 18,21 эВ), т. е. Be значительно менее электроположителен, чем Li . По этим причинам ионных форм Be в растворах не существует.

Несмотря на то что электронное строение элементов группы щелочно-земельных металлов подобно электронному строению Be , больший размер их атомов уменьшает влияние заряда ядра на валентные электроны. Ионная природа их соединений возрастает в ряду Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} ; и хотя некоторые соединения Mg^{2+} еще имеют ковалентный характер, все соединения Ca^{2+} обладают, по существу, ионными свойствами. Как и в случае элементов I группы, радиусы гидратированных ионов элементов II группы значительно больше их кристаллографических радиусов. Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} образуют ряд, в котором наблюдается систематическое изменение свойств в соответствии с изменением ионной и электроположительной природы элементов. Некоторые примеры этих систематических изменений таковы: изменение тенденции к гидратации кристаллических солей; уменьшение растворимости сульфатов, нитратов, хлоридов (но не фторидов); увеличение способности реагировать с водородом; способность стабилизировать перекисные и надперекисные анионы.

Из всех элементов группы щелочно-земельных металлов лишь Mg^{2+} и Ca^{2+} широко используются в живых организмах; остальные в большей или меньшей степени токсичны. Главная причина токсичности этих элементов заключается, видимо, в их высокой склонности образовывать ковалентные связи, вытеснении ионов Mg и Ca из биологических структур и необратимом связывании с этими структурами. Именно по этой причине особенно токсичен Be . Стронций мало распространен в биологических системах, однако его радиоактивный изотоп $^{90}Sr^{2+}$ достаточно опасен: он накапливается в костях, в результате чего возможно возникновение лейкемии. Барий встречается чаще стронция, его действие на организм не изучено, известно лишь, что соли Ba влияют на обмен Ca^{2+} в тканях; это не относится лишь к $BaSO_4$, имеющему незначительную растворимость.

При обычной диете у людей не бывает дефицита Mg^{2+} , за исключением случаев понижения содержания белка в пище или хро-

нического алкоголизма. Суточная потребность человека в Mg^{2+} составляет 200—300 мг, а общее количество Mg^{2+} в организме взрослого человека составляет около 20 г. Более половины этого количества оседает в костях в виде фосфорных солей. В некоторых случаях фосфат магния может оседать в мочевыводящих канальцах. Почти весь остальной Mg^{2+} является внутриклеточным.

Содержание Ca^{2+} в организме человека и животных определяется соотношением эффективности систем аккумуляции и выброса Ca^{2+} из организма. Дефицит Ca^{2+} возникает весьма редко. Он чаще всего может быть вызван дефектом метаболизма, при котором реализуется склонность Ca^{2+} образовывать нерастворимые соли с анионами, широко распространенными в пище, — оксалатом и фосфатом. Чаще всего встречается гиперкальциемия. Нарушения обмена Ca^{2+} , приводящие к колебаниям его уровня в кровяном русле, вызывают нарушения многих процессов жизнедеятельности, в том числе возбудимости нервной и мышечной тканей.

Значение Mg^{2+} для метаболизма может объясняться его свойствами как промотора структуры макромолекул, как субстрат-связывающего иона и как переносчика электронов. Последнее качество для Mg^{2+} мало существенно, так как он не имеет переменной валентности. Первое свойство также не особенно широко распространено, хотя установлена способность Mg^{2+} связываться с ДНК *in vitro*. Наиболее широко известна роль Mg^{2+} в образовании комплекса с АТФ — субстратом аденозинтрифосфатазных реакций; в этой роли магний является незаменимым. Полагают, что Mg^{2+} вступает во взаимодействие с фосфатными заряженными группами АТФ, поляризуя их и повышая реакционную способность системы, облегчая нуклеофильную атаку на терминальный фосфат АТФ. Наконец, есть длинный список Mg-зависимых ферментов, начиная от *пируватдекарбоксилазы* и кончая *ДНКазой*, где роль Mg^{2+} не ограничивается «активацией» субстрата, но связана с формированием активного (каталитического) центра фермента.

Магний как наиболее широко распространенный катион во внутриклеточном пространстве выступает природным активатором большинства ферментов, которые действуют на фосфорилированные субстраты, гидролизуя ангидриды фосфорной кислоты. Существует более 100 ферментов, для которых необходимы ионы Mg как кофактор катализируемых ими реакций. В большинстве случаев Ca^{2+} является антагонистом. Так, активатором сократительного ответа гладких мышц является внеклеточный Ca^{2+} , а повышение уровня Mg^{2+} во внешней среде индуцирует расслабление, препятствуя действию Ca^{2+} .

Как видно из табл. 17, по содержанию ионов Na, K, Ca и Mg цитоплазма клеток отличается от интерстициальной жидкости, которая, особенно в случае морских животных, приближается к составу морской воды. Чему служит такое селективное распределение ионов? Перечисленные здесь ионы в большинстве своем участвуют в осуществлении важных пусковых или контрольных механизмов клетки. Так, Ca^{2+} запускает работу кальмодулин-зави-

симых систем, а также сократительный аппарат, Na^+ может регулировать интенсивность белкового синтеза; градиент одновалентных ионов является источником энергии для процессов возбуждения, а также вторично-активного транспорта субстратов в клетку; вход Mg^{2+} в ядро нейтрализует заряд фосфата ДНК и стабилизирует двойную спираль. Эти данные означают, что изменение ионного гомеостаза может вызвать определенные биохимические последствия.

Часто в эксперименте, изучая роль ионов в той или иной ферментативной реакции, исследователи пытаются подменить одни ионы другими. Ферменты «замечают» подмену, но характер изменения их свойств, которые регистрируются экспериментатором, может дать важную информацию. Так, ионы Mg , которые необходимы для всех ферментативных реакций, включающих перенос фосфатной группы (фосфатазы, киназы, полимеразы), можно заменить ионами Mn^{2+} более эффективно, чем ионами Ni^{2+} , хотя у последнего ионный радиус ближе к радиусу Mg^{2+} . В ряде случаев лантан может заменять кальций, несмотря на разницу в их зарядах. Таллий обладает даже бóльшим сродством к Na , K -АТФазе, чем калий. Железо в дыхательной цепи частично можно заменить на гадолиний. Такой подход перспективен для исследования взаимодействия межбелковых комплексов, поскольку марганец является парамагнитным ионом-тушителем спинового сигнала, гадолиний эффективно тушит белковую флуоресценцию. Связывание Mg^{2+} с заряженными группами нуклеиновых кислот хорошо имитирует Cu^{2+} , но с отличным от Mg^{2+} результатом: медь дестабилизирует двойную спираль, способствуя ее раскручиванию, так как связывается не только с фосфатными группами, но и с азотистыми основаниями.

Создание ионной асимметрии клетки обеспечивается активным транспортом Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и H^+ . Этот процесс осуществляется специальными транспортными системами.

ВОПРОСЫ

1. Градиент каких ионов создается на клеточной мембране и каков механизм его поддержания.
2. Биологические особенности основных ионов — регуляторов метаболизма: калия, натрия, магния и кальция.
3. Физико-химические свойства щелочных и щелочно-земельных ионов.
4. Каково направление (и выраженность) ионных градиентов на клеточных мембранах различного происхождения (плазматических, митохондриальной, эндоплазматического ретикулума).
5. Сходство и отличия от «биологически-активных» ионов их аналогов: стронция, бериллия, бария, лития, таллия.

III.3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПЕРВИЧНО-АКТИВНОГО ТРАНСПОРТА ИОНОВ

Источник энергии для первично-активного транспорта ионов — АТФ. Вот почему все ионные насосы одновременно являются ферментами, гидролизующими АТФ, — АТФазами. Все транспортные АТФазы прокариотических и эукариотических клеток можно разделить на три типа: АТФазы *P*-типа, *V*-типа и *F*-типа.

Общим свойством АТФаз первого типа является способность образовывать ковалентный фосфорилированный интермедиат (*P*), участвующий в реакционном цикле. К АТФазам этого типа относятся Na,К-АТФаза, Са-АТФаза и Н-АТФаза плазматической мембраны эукариотических клеток и Са-АТФаза эндо(сарко)плазматического ретикулума. К-АТФаза наружной мембраны прокариот (*E. coli*, *Streptococcus faecalis*) также относится к этому типу.

Ранее АТФазы *P*-типа называли ферментами E_1/E_2 -типа. Переименовали их по той причине, что есть и другие ферменты, не имеющие отношения к транспорту ионов (например, миозиновая АТФаза), которые функционируют, попеременно находясь в E_1 и E_2 конформациях.

Ион-транспортующие АТФазы типа *V* относятся к мембраносвязанным структурам, которые отличаются от митохондрий и эндоплазматического ретикулума. Они обнаруживаются в вакуолях дрожжей и тонопластах растений, а также в лизосомах, эндосомах, секреторных гранулах и т. д. (табл. 18). Хотя эти АТФазы из всех трех типов ион-транспортующих систем наименее изучены, они, вероятно, наиболее широко распространены.

АТФазы *F*-типа (называемых также $(F_0 + F_1)$ -АТФазами) обнаруживаются в мембранах бактерий, в хлоропластах и митохондриях. Они имеют очень сложное устройство: содержат водорастворимую часть F_1 , состоящую из нескольких субъединиц и обладающую каталитической активностью (способна катализировать как синтез, так и гидролиз АТФ), и гидрофобную часть F_0 , участвующую в транслокации H^+ . В клетке ферменты первых двух типов выступают как потребители, а третьего — как продуценты аденозинтрифосфата. На рис. 40 схематически изображено устройство всех трех АТФ-превращающих систем; ниже дана их краткая характеристика.

III.3.1. АТФазы *P*-типа

В ходе функционирования АТФаз этого типа терминальный фосфат АТФ переносится на карбоксил аспарагиновой кислоты активного центра, образуя быстропревращающийся фосфофермент ЕР. Вместо фосфата в активном центре с высоким сродством способен связываться ванадат-ион, который является специфическим и высокоэффективным ингибитором АТФаз *P*-типа.

Структурно эти АТФазы состоят из основной (α) субъединицы, содержащей АТФ-связывающий и фосфорилирующий центры

Примеры некоторых ион-транспортующих АТФаз

Ионы, переносимые АТФазой	Источник	Мембрана	Тип АТФазы
H ⁺	низшие эукариоты (грибы, дрожжи)	плазматическая	P
H ⁺	высшие эукариоты	плазматическая	P
	растения	плазматическая (мочевыводящего пузыря и опухолевой клетки)	P
	животные	внутренняя	P
K ⁺	<i>E. coli</i> , <i>S. faecalis</i>	внутренняя	P
H ⁺ /K ⁺	высшие эукариоты (животные)	плазматическая (слизистой оболочки)	P
H ⁺ /K ⁺	высшие эукариоты (животные)	плазматическая	P
Ca ²⁺	высшие эукариоты (животные)	плазматическая	P
Ca ²⁺	высшие эукариоты (животные)	саркоплазматический ретикулум	P
Ca ²⁺	высшие эукариоты (животные)	лизосомы, аппарат Гольджи	P
H ⁺	низшие эукариоты (грибы, дрожжи)	вакуоли	V
H ⁺	высшие эукариоты (растения)	тонопласты	V
H ⁺	высшие эукариоты (животные)	лизосомы	V
H ⁺	высшие эукариоты (животные)	эндосомы	V
H ⁺	высшие эукариоты (животные)	секреторные гранулы	V
H ⁺	высшие эукариоты (животные)	запасные гранулы	V
H ⁺	высшие эукариоты (животные)	везикулы, покрытые клатрином	V
H ⁺	большинство бактерий	внутренняя	F
H ⁺	эукариоты		
	растения и животные	митохондриальная	F
H ⁺	растения	тилакоиды хлоропластов	F

(70—100 кДа). Na,K-АТФаза содержит еще и β -субъединицу размером 45—55 кДа. Она обычно гликозилирована; функция ее не установлена. Существуют предположения, что ее роль заключается в облегчении встраивания α -субъединицы в мембрану, в обеспечении верной ориентации α -субъединицы в мембране или облегчения ее взаимодействия со специфическим ингибитором Na,K-АТФазы — убаином. Действительно, гликозилированная часть β -субъединицы расположена на внешней стороне мембраны и может выполнять рецепторные функции.

С цитоплазматической стороны мембраны Na,K-АТФаза через анкерин соединяется с цитоскелетом, так что структурное состояние клеточного «скелета» может оказать на нее непосредственное влияние. В ряде работ высказывалось предположение о включении в состав Na,K-АТФазной системы еще одного белка: γ -субъединицы с мол. массой 10—12 кДа. Однако последние работы показывают, что это, вероятно, не индивидуальный полипептид, а продукт частичного протеолиза α - или β -цепей. Компонировка в мембране $\alpha\beta$ -комплекса, носящего название протомера Na,K-АТФазы, изображена на рис. 41.

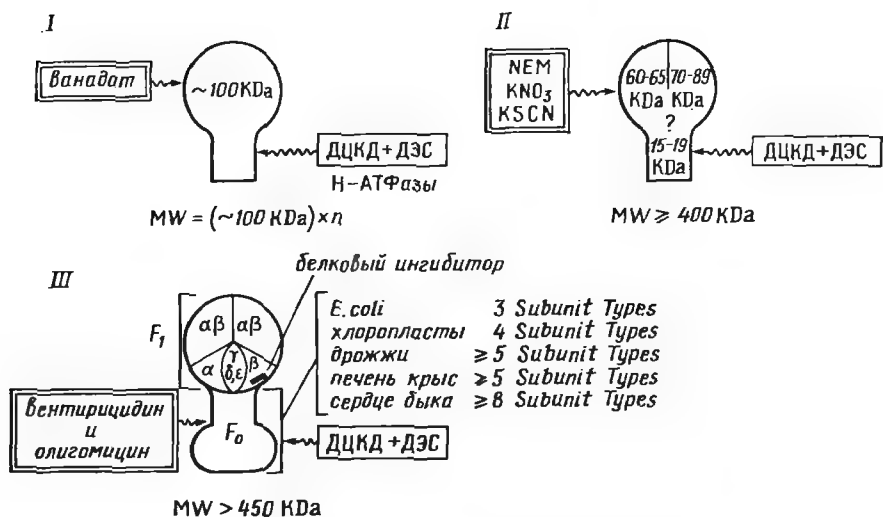


Рис. 40. Молекулярная масса, структура и ингибиторы АТФаз Р-типа (I), V-типа (II) и F-типа (III). Объяснения в тексте

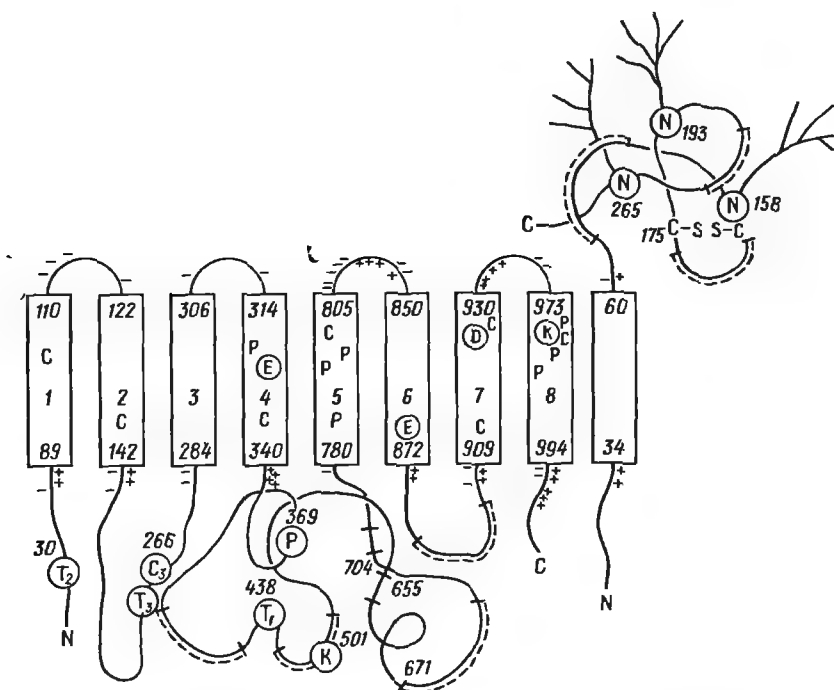
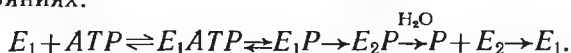


Рис. 41. Предполагаемая упаковка протомера Na, K-АТФазы

В настоящее время почти полностью установлена первичная структура АТФаз Р-типа. Оказалось, что между ними обнаруживается глубокая аналогия. По-видимому, синтез отдельных «блоков» этих ферментов управляется общей группой генов. Так, при сравнении Na,K-АТФазы почек с Са-АТФазой сердца обнаруживается, что каждый из восьми гидрофобных доменов первого фермента имеет свой аналог во втором. Участки связывания АТФ и фосфорилирования идентичны. Аминокислотная последовательность в области аспарагина, обеспечивающего образование ЕР, установленная для Na,K-АТФазы почек, почти полностью повторяется в соответствующих участках Н-АТФазы слизистой кишечника ряда животных и К-АТФазы бактерий.

Фосфофермент АТФаз Р-типа существует в двух конформационных состояниях:



При переходе между ними наблюдаются изменения спектральных характеристик фермента (собственная флуоресценция), α-спиральности (по данным кругового дихроизма); различаются Е₁ и Е₂ формы по доступности трипсину: он разрывает различные пептидные связи, образуя разный набор пептидов при гидролизе трипсином в среде с Na⁺ или K⁺. Переход Е₁→Е₂ снимает барьер гидрофобности, препятствующий доступу молекул воды к месту гидролиза ацилфосфатной связи ЕР (De Meis, 1986, 1988).

Переход Е₁→Е₂ не является одномоментным. В определенный момент этого перехода возникает ситуация, когда ионы-активаторы, переносимые в ходе этого этапа через мембрану, становятся недоступны для обмена со средой ни с внешней, ни с внутренней стороны бислоя. Это состояние, обнаруженное в 1982 г. Карлишем и Глином, носит название *окклюдированного состояния фермента* и позволяет зафиксировать его в момент транспорта ионов через мембрану.

Разнообразными методами показано, что АТФазы Р-типа образуют в мембране олигомерные ассоциаты из 2—4 протомеров. Функция их не установлена. Полагают, что мономер свободный или в составе олигомера обладает различной эффективностью транспортного процесса.

При сравнении Na,K-АТФазы с Са-АТФазой в первичной структуре последней обнаружен своеобразный кластер остатков глутаминовой кислоты, образующий α-спиральный участок. Вероятно, эта часть молекулы образует специфический центр связывания Са²⁺, отсутствующий у Na,K-АТФазы (рис. 42).

Все АТФазы Р-типа отличаются друг от друга по чувствительности к модификаторам: кроме *ванадата*, являющегося сильным ингибитором всех этих АТФаз, Na,K-АТФаза ингибируется сердечными гликозидами (*убаином*, *строфангином К*), Н-АТФазы плазматических мембран — *дицклогексилкарбодиимидом* (ДЦКД) и *диэтилстильбэстролом* (ДЭС). Са-АТФаза саркоплазматического ретикулула высоко чувствительна к *тиоловым ядам*.

Са-АТФаза ретикулума сердца активируется *фосфоламб-ном* — гидрофобным белком, способным фосфорилиро-ваться протеинкиназами и изменять сопряжение Са-на-соса. Са-АТФаза плазматической мембраны активируется белко-вым регулятором — *кальмодулином*.

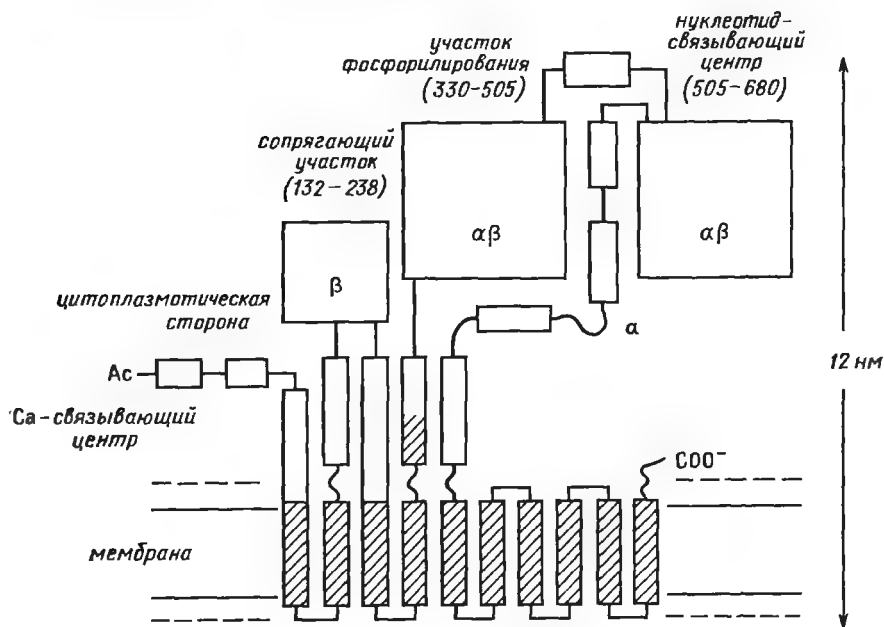


Рис. 42. Организация Са-АТФазы в мембране

Изучение Р-АТФаз показывает, что одна и та же ферментная система может проявлять разные свойства в разных клетках. Н-АТФаза слизистой кишечника высших эукариот обменивает в процессе транспорта H^+ на K^+ , а тот же фермент у *Neurospora* осуществляет электрогенный активный транспорт H^+ . Н-АТФаза дрожжей может функционировать как в электронейтральном, так и в электрогенном режиме.

III.3.2. АТФазы Y-типа

Эта группа АТФаз изучена хуже остальных; авторы постулируют три основных свойства, присущие этим ферментам:

- 1) Все они являются переносчиками протона;
- 2) в ходе каталитического цикла для них не показано образования ковалентного фосфорилированного интермедната;
- 3) эти ферменты в отличие от большинства ферментов первой группы и аналогично ферментам третьей группы представ-

ляют собой высокомолекулярные мультисубъединичные комплексы. По-видимому, гидролиз АТФ и перенос протона осуществляются функциональными группами, принадлежащими разным субъединицам.

Молекулярные массы этих ферментов представляют собой величину порядка 400 кД. У V-АТФаз дрожжей, растений и нейроспоры обнаруживаются две основные белковые субъединицы (60—65 и 70—89 кДа) и одна меньшая субъединица (15—19 кДа), обладающая способностью связывать ДЦКД. V-АТФаза хромаффинных гранул содержит 4 белковые цепи с массами 115, 72, 57 и 39 кД, причем ДЦКД связывается с большей из них.

Кроме ДЦКД АТФазы V-типа блокируются трибутилтином, SH-реагентами (N-ЭМ и НБД-Cl), хаотропными агентами (KSCN). Ни олигомицин — ингибитор F-АТФаз, ни ванадат не действуют на эти системы.

V-АТФазы участвуют в клетке в процессе транспорта анионов, аминокислот, репарации мембран при эндо- и экзоцитозе. Целостность мембран хромаффинных гранул с норадреналином, серотониновых везикул тромбоцитов определяется активностью H-АТФазы V-типа. Они определяют также скорость рециклизации рецепторов на клеточной мембране. Не ясна функция V-АТФаз в одетых клатрином везикулах и лизосомах.

III.3.3. Свойства АТФаз F-типа

В работе F-АТФаз участвуют прочно связанные нуклеотиды как в миозиновой АТФазе, однако в отличие от последней в ходе гидролиза АТФ они не образуют ковалентного фосфорилированного интермедиата. У аэробных организмов эти АТФазы преимущественно работают на синтез АТФ; при этом создаваемый компартментом F_0 градиент протонов создает условия для отщепления прочно связанного АТФ, вместо которого происходит связывание субстратов для синтеза следующей молекулы аденозинтрифосфата.

Олигомерная структура этих ферментов с молекулярной массой свыше 450 кД очень сложна. У *E. coli* фермент содержит 8 различных полипептидных цепей, у хлоропластов — 8 или 9, в дрожжах и печени крысы — по крайней мере 10, а в сердце быка — 13. Основные различия между этими ферментами обнаруживаются не в структуре F_1 -части, а в гидрофобном F_0 -компоненте, погруженном в мембрану. Так, F-АТФаза бактерий, животных и растений имеет F_1 -часть, состоящую из 5 различных полипептидных цепей. Число полипептидов в F_0 колеблется от 3 (*E. coli*) до 8 (сердце быка). Наиболее просто устроены АТФазы архебактерий.

Полный F_1 -комплекс в большинстве случаев содержит 5 разных субъединиц в сочетании $\alpha_3\beta\gamma\delta\epsilon$. α и β имеют молекулярную массу 50—60 кДа, γ — 30—36, а δ и ϵ — менее 20 кДа.

При анализе структуры F_1 и связывания липидов в его составе обнаружены 3 $\alpha\beta$ неравноценные пары. Одна существенно больше, чем 2 остальные; именно к ней примыкают меньшие субъединицы. Анализ первичной структуры выполнен для всех субъединиц F_1 -комплекса: существуют обширные гомологичные участки между α -, β - и γ -субъединицами всех изученных видов. Возможно, что, по крайней мере, α и β «происходят» из одного гена. Напротив, δ - и ϵ -субъединицы бактерий, растений и животных почти не имеют гомологичных участков. Роль этих пептидов, вероятно, заключается в том, чтобы обеспечивать связь F_1 с F_0 .

F_1 имеет, по крайней мере, 3 участка связывания нуклеотидов, которые принадлежат β -субъединице или расположены погранично между α и β . В дополнение к ним чаще всего обнаруживается центр для связывания нуклеотидов, причем степень прочности связи может варьировать в соответствии с филогенетическим положением объекта. Эти участки также расположены на стыке α - и β -субъединиц. В препаратах F_1 из сердца быка обнаруживаются 3 участка для прочно связанных нуклеотидов, в других случаях (например, в печени крысы) обнаруживается лишь один участок на комплекс.

F_1 содержит также центр для прочно связанного магния, более двух фосфат-связывающих центров, один центр для ингибиторного белка и неопределенное число активирующих (оксанион-связывающих) доменов. Максимальное число лиганд-связывающих центров на F_1 может достигать 12 или более (Pedersen, Sagafohi, 1987).

F_0 -участок также сложно устроен. У *E. coli* он состоит из трех различных полипептидов: a , b и c , причем последний является ДЦКД-связывающим белком. Его количество в F_0 может достигать 10 на 1 ($F_0 + F_1$)-комплекс. Он может образовывать канал для протонов, текущих к F_1 . Однако этот канал может быть образован только в присутствии субъединиц a и b .

У эукариот для синтеза АТФ кроме указанных полипептидов необходимы и другие: F_b , d , F_d (белок, содержащий дитиогруппировку) и ряд других. Все они, по-видимому, обеспечивают «верную» координацию F_1 относительно F_0 -фактора, необходимого для превращения $\Delta\mu\text{H}^+$ в АТФ (Скулачев, 1988).

На активность F_0 действует целый ряд факторов — олигомицин, ДЦКД, вентурицидин, меркуриалы, кадмий. Чувствительность к этим соединениям у разных объектов варьирует.

Механизм сопряжения ионных потоков с гидролизом (P -АТФазы) или синтезом (F -АТФазы) АТФ исследован не до конца и лучше для гидролизующих, чем синтезирующих АТФ ферментов. Общий принцип состоит в том, что в субстрат(продукт)-связывающем центре происходит изменение гидрофобности и доступности для воды, фосфат-связывающей группы; это приводит к водной атаке конформации E_2P и гидролизу фосфата (P -АТФазы) или к

изменению сродства к АТФ в участке прочного связывания и высвобождения АТФ в среду (F-АТФазы).

В обоих случаях движущей силой являются изменение состояния конформационно-лабильных полипептидов олигомерного комплекса и перестройка межбелковых взаимодействий. Поэтому ясно, что эти АТФазы представляют собой системы, чувствительные к фазовому состоянию липидов и к гидрофобным модификаторам.

ВОПРОСЫ

1. *Классификация транспортных АТФаз.*
2. *Биологическое значение Р-АТФаз.*
3. *Спланируйте эксперимент, из которого можно оценить, как липиды контролируют активность олигомерных мембранных АТФаз.*
4. *Какова роль гидрофобного окружения в функционировании F-АТФаз?*
5. *Назовите специфические ингибиторы для АТФаз каждого типа.*

Глава IV. ПРЕВРАЩЕНИЕ ЭНЕРГИИ В БИОМЕМБРАНАХ

IV.1. ЭНЕРГОПРЕОБРАЗУЮЩИЕ МЕМБРАНЫ

Биологические мембраны способны преобразовывать энергию в форму, необходимую клетке для осуществления метаболизма, механической работы, осмотических функций, выработки тепла для терморегуляции и ряда других энергетических процессов. Биомембраны, обладающие такими свойствами, называются **энергопреобразующими**. Они способны превращать химическую энергию или энергию квантов света в электрическую через формирование разности потенциалов ($\Delta\psi$) и энергию разности концентрации веществ, содержащихся в разделенных мембраной растворах. К энергопреобразующим мембранам относятся следующие структуры клеток гетеротрофных животных: внутренняя мембрана митохондрий, внутренняя (цитоплазматическая) мембрана бактерий, внешняя мембрана клеток эукариот, а также мембраны аутотрофов, способные преобразовывать энергию света, — мембрана бактериальных хромофоров, тилакоидов хлоропластов и цианобактерий, вакуолярная мембрана (тонопласт) растений и грибов.

В. П. Скулачев предлагает следующую классификацию **энергопреобразующих мембран**.

1. Внутренняя мембрана митохондрий.
2. Мембрана тилакоидов хлоропластов.
3. Внутренняя мембрана оболочки хлоропластов.
4. Внутренняя (цитоплазматическая) мембрана многих бактерий.
5. Мембрана бактериальных хромофоров.
6. Внешняя мембрана клеток растений и грибов.
7. Мембрана вакуолей (тонопласт) растений и грибов.
8. Мембрана хромаффинных и некоторых других секреторных гранул животной клетки.

Энергопреобразующие мембраны, использующие Na^+ как сопрягающий ион.

1. Наружная мембрана животной клетки.
2. Внутренняя (цитоплазматическая) мембрана некоторых морских щелочеустойчивых аэробных бактерий и морских анаэробных бактерий.

Энергопреобразующие мембраны, роль которых ограничивается созданием ионного градиента.

1. Мембраны лизосом и, вероятно, аппарата Гольджи ($\text{ATP} \rightarrow \Delta\mu\text{H}^+$).

2. Внешняя мембрана некоторых животных клеток, например клеток слизистой желудка ($ATF \rightarrow \Delta\mu H^+$).

3. Саркоплазматический ретикулум и другие пузырьки, накапливающие Ca^{2+} ($ATF \rightarrow \Delta\mu Ca^{2+}$).

Мембраны, не способные к превращению энергии.

1. Внешняя мембрана митохондрий.

2. Внешняя мембрана оболочки хлоропластов.

3. Внешняя мембрана бактерий.

4. Мембраны пероксисом.

Мембраны, энергетические функции которых не доказаны, но и не исключены.

1. Эндоплазматический ретикулум (микросомы).

2. Мембраны клеточного ядра.

Общим свойством всех энергопреобразующих мембран является их очень низкая проницаемость. Следовательно, мембранные структуры, имеющие большие поры и осуществляющие транспорт больших молекул (например, ядерная мембрана или внешняя мембрана митохондрий, внешняя мембрана бактериальных клеток), не могут быть энергопреобразующими, так как на них, в силу наличия специальных пор, не может быть создан градиент ионов.

Долгое время считалось, что мембраны эндоплазматического ретикулума и аппарат Гольджи так же не могут участвовать в процессах трансформации энергии. Тем не менее недавно удалось доказать, что в аппарате Гольджи возможно создание градиента рН между цитоплазмой и внутренним объемом везикул за счет энергии АТФ. По-видимому, какие-то фрагменты эндоплазматической сети и родственные ей мембраны ядра все-таки могут осуществлять функции, связанные с преобразованием энергии. Однако в настоящее время этот вопрос остается не выясненным.

Энергопреобразующие биологические мембраны превращают химическую энергию окисления субстратов или энергию света через образование разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) или через образование разности концентраций веществ по обе стороны мембраны в энергию АТФ. Преобразование энергии в биомембранах может быть описано следующей схемой:

энергетические ресурсы $\rightarrow \Delta\mu I \rightarrow$ полезная работа, где $\Delta\mu I$ — трансмембранная разность электрических потенциалов, которая состоит из двух компонентов трансмембранной разности концентраций ионов ($\Delta\mu I$): электрического (трансмембранной разности потенциалов — $\Delta\psi$) и химического (концентрационного или осмотического). Энергетические ресурсы, потребляемые мембранной системой, сначала используются для транспорта иона (I) через мембрану против сил энергетического поля и в направлении большей концентрации данного иона. Первая стадия преобразования энергии называется *энергизацией мембраны*. В следующей стадии осмотическая и электрическая энергии через специализированные мембранные механизмы (сопрягающие факторы) преобразуются в полезную работу.

IV.1.1. Сопрягающие ионы

Процессы утилизации энергетических ресурсов и производство полезной работы сопрягаются через $\Delta\mu$. Ион (I), участвующий в этом процессе, называется сопрягающим. Как правило, сопрягающим ионом является H^+ . Однако в плазматической мембране животной клетки и в клетках прокариот в качестве сопрягающего иона может использоваться Na^+ (рис. 43).

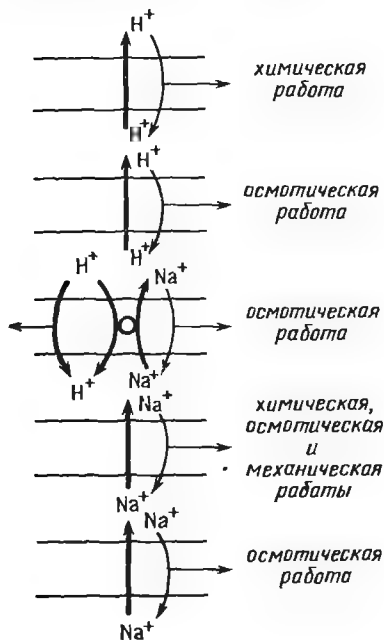


Рис. 43. Схема путей преобразования электрохимического потенциала, сопряженного с переносом через мембрану Na^+ и H^+ в полезную работу (Скулачев, 1988)

В разделах III.2, III.3 было показано, что не только H^+ и Na^+ , но и Ca^{2+} и K^+ (Na, K-АТФаза) могут транспортироваться в клетке против градиента, концентрации и электрохимического градиента. При этом создается трансмембранная разность потенциалов. Однако она так же, как и градиент ионов Cl^- , по-видимому, никогда не используется для совершения полезной работы. Тем не менее в экспериментах *in vitro* ряд АТФаз (например, Са-АТФаза при выбросе Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума) могут синтезировать АТФ.

Энергия $\Delta\mu H^+$ и $\Delta\mu Na^+$ обратно превращается в энергию АТФ. Сопрягающими факторами в этих процессах могут служить H-АТФ-синтетаза (H-АТФаза) или Na-АТФ-синтетаза (Na-АТФаза), а также Na,K-АТФаза. При синтезе АТФ в митохондриях животных в качестве сопрягающего иона используется H^+ . Механизм сопря-

жения синтеза АТФ через градиент ионов водорода на внутренней мембране митохондрий был постулирован в 1961 г. П. Митчелом и вскоре подтвержден в блестящих экспериментах В. П. Скулачева и Е. Д. Либермана. При работе Na- и Na,K-АТФаз сопрягающим ионом служит Na^+ . Этот механизм сопряжения $\Delta\mu H^+$ с синтезом АТФ реализуется на внутренней мембране некоторых бактериальных клеток. В ряде случаев Na^+ используется не только как первичный сопрягающий ион, но и в качестве вторичного сопрягающего иона, градиент которого образуется за счет энергии протонного потенциала и потребляется для его регенерации или совершения осмотической работы. Схема реализации электрохимического потенциала H^+ и Na^+ приведена на рис. 43.

Согласно современным представлениям (Кагава, 1985; Скулачев, 1988), сопрягающие ионы H^+ и Na^+ могут участвовать по крайней мере в 5 различных процессах преобразования электрохимического потенциала в три вида полезной работы в зависимости от типа мембранных структур. При этом под химической работой подразумевают синтез АТФ, синтез неорганического пирофосфата, перенос восстановленных эквивалентов в направлении более отрицательных редокс-потенциалов, обратный перенос электронов в дыхательной цепи. Под механической работой имеют в виду преобразование электрохимической энергии в движение, например вращение жгутиков одноклеточных организмов. Осмотическая работа связана с транспортом веществ против градиента их концентрации.

Все эти виды работы могут совершаться в клетке вне энергопреобразующих мембранных структур, без создания электрохимического потенциала. Так, АТФ образуется при субстратном фосфорилировании в реакциях гликолиза и при окислительном декарбоксилировании α -кетоглутаровой кислоты, а осмотическая и механическая работы совершаются за счет АТФ и некоторых других высокоэнергетических соединений клетки. Однако образование АТФ за счет генерации $\Delta\mu H^+$ — основной путь синтеза главного энергетического соединения живой клетки.

IV.1.2. Генерация электрохимического потенциала

$\Delta\mu H^+$ может образовываться за счет энергетических ресурсов, поступающих в клетку из внешней среды (света, субстратов окисления), а также макроэнергетических соединений (АТФ, пирофосфат) и градиента, предварительно созданного за счет использования уже имевшегося $\Delta\mu H^+$.

Системы, образующие $\Delta\mu H^+$ из внешних ресурсов, называются *первичными генераторами*, а системы, образующие электрохимический потенциал за счет внутренних ресурсов, — *вторичными генераторами* $\Delta\mu H^+$. К первичным генераторам $\Delta\mu H^+$ относятся мембраны фотосинтезирующих бактерий (которые преобразуют энергию света в $\Delta\mu H^+$ с помощью трех различных механизмов: циклической редокс-цепи, нециклической редокс-цепи и с помощью бактериородопсина), компоненты электрон-транспортной цепи митохондрий, мембраны хлоропластов.

ВОПРОСЫ

1. Какие мембранные структуры называются энергопреобразующими?
2. Как сопрягаются различные формы энергии в мембране? Что такое сопрягающие ионы?
3. Могут ли совершаться различные виды химической работы вне энергопреобразующих мембран?

4. Как происходит генерация электрохимического потенциала?
5. Какие использующиеся в современной технике преобразователи энергии можно сравнить с энергопреобразующими биологическими мембранами?

IV.2. БАКТЕРИОРОДОПСИН

Бактериородопсин — наиболее простой и хорошо изученный продуцент $\Delta\mu\text{H}^+$. Этот белок, содержащий в своем активном центре ретиналь, был обнаружен в бактерии *Halobacterium halobium* в 1971 г. Д. Остерхельтом и В. Стокениусом. Вскоре было показано, что бактериородопсин является светозависимым Н-насосом. Бактериородопсин имеет два существенных отличия от остальных $\Delta\mu\text{H}^+$ -генераторов. Во-первых, это белок сравнительно небольшой массы — 26 кДа, что значительно меньше, чем у всех других известных в настоящее время $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов, во-вторых, он функционирует один, без участия других белков, осуществляющих перенос электронов и составляющих электрон-транспортные цепи. Состав электрон-транспортных цепей некоторых энергопреобразующих мембран и микросом будет описан ниже (см. разд. IV.3).

Для полной расшифровки механизма действия мембранного белка очень важно знать его первичную структуру и расположение его частей в мембране. Бактериородопсин был первым белком, генерирующим $\Delta\mu\text{H}^+$, для которого были полностью установлены первичная структура и локализация его фрагментов в мембране. Этот белок расположен в специализированных областях цитоплазматической мембраны пурпурных бактерий, в так называемых пурпурных бляшках. Кроме этого он обладает свойством образовывать в мембране *H. halobium* тримеры, причем каждый тример окружен шестью другими так, что образуется правильная гексагональная решетка, и мембрана пурпурных бактерий может рассматриваться как естественный двумерный кристалл. Эти особенности бактериородопсина позволили Р. Хендерсону и П. Ануин в 1975 г. с помощью рентгеноструктурного анализа построить молекулярную модель белка, изображенную на рис. 44. Семь α -спиралей пересекают мембрану, образуя замкнутую группу колонн высотой около 3,5 нм (рис. 44).

Первичная структура бактериородопсина была установлена в 1979 г. Ю. А. Овчинниковым с группой сотрудников и чуть позднее подтверждена Г. Кораной. Бактериородопсин — это первый мембранный белок, для которого была полностью установлена первичная структура. Трудности анализа мембранных белков состоят в том, что они нерастворимы в водных буферных системах, и расщепление их на фрагменты с помощью протеаз (традиционный метод анализа) практически невозможно. Для расщепления бактериородопсина применялись химические методы, а образовавшиеся фрагменты разделялись на биогелях, уравновешенных кон-

центрированным раствором муравьиной кислоты. Принцип изучения топографии мембранных белков, полученных при изучении бактериородопсина, был применен впоследствии для изучения первичной структуры других мембранных белков. Было показано, что 248 аминокислот этого белка последовательно распределены так, что гидрофобные аминокислоты составляют семь приблизительно равных участков длиной по 24—28 аминокислот, соединяю-

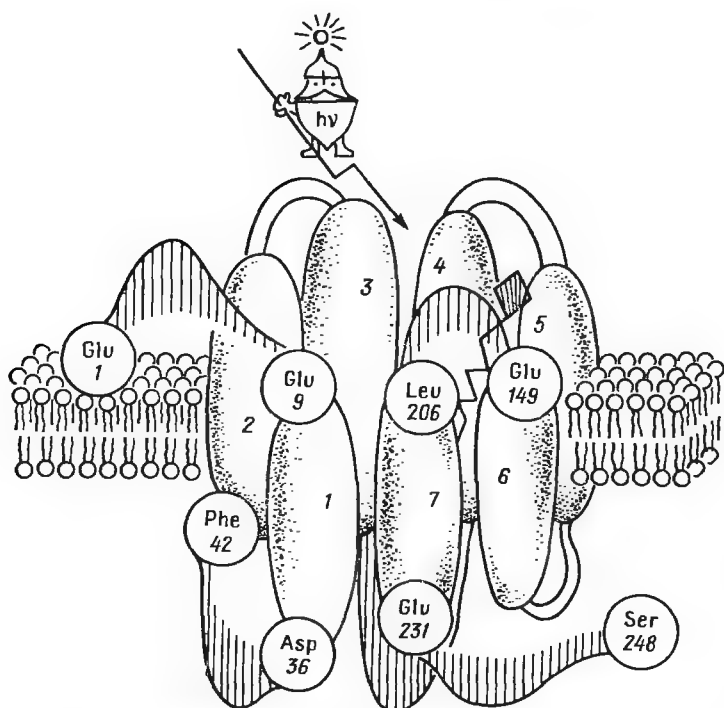


Рис. 44. Структура бактериородопсина. 1—7 — фрагменты родопсина, пронизывающие мембрану

щихся последовательностью значительно более гидрофильных аминокислот (см. рис. 44). С-конец содержит самую длинную (более 20) последовательность гидрофильных аминокислот.

Наличие семи гидрофильных участков и семи колонн, пронизывающих мембрану, позволило Ю. А. Овчинникову с коллегами предложить схему упаковки полипептидной цепи бактериородопсина. Гидрофобные последовательности составили «колонны», пронизывающие мембрану, а гидрофильные последовательности — мостики, соединяющие эти колонны.

Бляшки, содержащие родопсин, как и другие мембранные структуры, могут быть получены в виде замкнутых везикул раз-

личной ориентации: нормальные и вывернутые внутренней стороной мембраны наружу. Это позволяет использовать моноклональные антитела к различным фрагментам родопсина и устанавливать, какие части полипептидной цепи ориентированы наружу, а какие — вовнутрь клетки. С помощью этих методов, а также отщепляя внешние фрагменты протеазами, было показано, что N-конец полипептидной цепи обращен на внешнюю поверхность мембраны, а С-конец — вовнутрь. Кроме этого были определены аминокислоты, образующие гидрофильные мостики с наружной и внутренней сторон мембраны, формирующие связи между колоннами. Остаток ретиналя связан с Lys-216 и локализован в седьмой колонне (см. рис. 44). Методом линейного дихроизма было показано, что плоскость *транс*-ретиналя в молекуле бактериородопсина наклонена под углом $19\text{--}28^\circ$ относительно внешней поверхности мембраны. С помощью специальных спектральных методов было установлено, что ретиналь залегает на глубине $0,6\text{--}0,9$ нм от внешней поверхности мембраны. Эти данные хорошо согласуются и с результатами, полученными ранее группой сотрудников под руководством В. П. Скулачева на основе измерения сверхбыстрой кинетики генерации $\Delta\mu\text{H}^+$ бактериородопсином.

Окончательно механизм генерации $\Delta\mu\text{H}^+$ мембранами пурпурных бляшек не расшифрован, несмотря на то, что в настоящее время с помощью геной инженерии удалось получить около 15 мутантных форм бактериородопсина, в которых замена тех или иных аминокислот позволяет определить их участие в трансмембранном переносе H^+ . Таким образом, даже полностью зная первичную структуру мембранного белка, структуру его активного центра и «упаковку» в мембране, не всегда удастся полностью расшифровать механизм его работы.

На основе исследования быстрой кинетики генерации $\Delta\mu\text{H}^+$ в ответ на освещение родопсина лазером в наносекундном режиме В. П. Скулачев с коллегами предлагают следующую четырехстадийную схему работы бактериородопсина.

В I стадии и поглощение фотона *транс*-ретиналем родопсина вызывает его изомеризацию в β -*цис*-ретиналь. При этом оказывается, что полиеновая цепь ретиналя фиксирована в молекуле белка, а шиффово основание в результате изомеризации перемещается. Причем это перемещение приводит к передвижению основания из области, благоприятной для протонирования, в окружение, где свободно осуществляется депротонирование.

Во II стадии шиффово основание, оказавшись на новом месте, освобождает протон, который транспортируется по выходному H^+ -проводящему пути к периплазматической поверхности мембраны.

В стадии III депротонированный остаток β -*цис*-ретиналя переносится в исходное положение, протонируется какой-либо протеолитической группой белка и изомеризуется в полностью *транс*-изомер.

В IV стадии депротонированная группа репротонируется H^+ , перенесенным по входному H^+ -пути, который соединяет цитоплазматическую поверхность мембраны с местом, где находится шиффово основание.

Было показано, что удаление трех аминокислот с N-конца, семнадцати аминокислот с C-конца, а также пяти аминокислот (от Met-61 до Gly-72) из гидрофильного мостика между 2 и 3 α -спиралями не влияет на транспорт протонов и кинетику отдельных электрогенных связей. В лаборатории Кораны было показано, что даже расщепление родопсина на два фрагмента и последующая его реконструкция в протеолипосомах также не приводят к утрате его способности к светозависимому переносу ионов водорода.

IV.2.1. Липиды мембран пурпурных бляшек

Липиды мембран, содержащих бактериородопсин, по-видимому, не принимают непосредственного участия в формировании $\Delta\mu H^+$, ограничиваясь, как и в других энергопреобразующих мембранах, ролью электроизолятора. Тем не менее на липидном составе мембран пурпурных бляшек стоит остановиться подробнее, так как они имеют существенные отличия от липидов мембран животных, описанных в разделе I.1.1. Эти особенности связаны в первую очередь с тем, что *H. halobium* не только солелюбивая бактерия (галофил), но и термофил. Функционирование при высокой температуре и сохранение при этом низкой проницаемости для ионов требуют особых свойств, которые достигаются за счет того, что липиды термофильных бактерий относятся к классу терпеновых углеводов. По-видимому, разветвленные бифитанильные тетраэфиры дают более прочную упаковку при высокой температуре, чем ненасыщенные жирные кислоты (см. разд. I.1.1).

На один тример молекулы бактериородопсина приходится около 30 молекул липида, при этом три из них расположены в центре тримера. В отличие от фосфолипидов мембран животных клеток углеводородные цепи липидов бляшек бактерий образованы остатками спиртов, а не жирных кислот. Это, вероятно, также придает большую стабильность мембранам при повышенных температурах.

IV.2.2. Галородопсин и сенсорный родопсин

Бактериородопсин, осуществляющий преобразование энергии света в $\Delta\mu H^+$, не единственный ретиналь-содержащий белок у *H. halobium*. Существуют, по крайней мере, еще три белка, выполняющих другие функции: галородопсин, сенсорный родопсин и фобородопсин.

Галородопсин, локализованный вне пурпурных бляшек и более чем на 70% отличающийся по аминокислотному составу от бактериородопсина, осуществляет возврат в клетку ионов Cl^- , выбрасываемых через мембрану в результате генерации $\Delta\mu\text{H}^+$ и работы дыхательной цепи. Сенсорный родопсин передает сигнал к движению жгутиков в направлении красного света. Фобородопсин отвечает за репеллентное действие на *H. halobium* синего цвета.

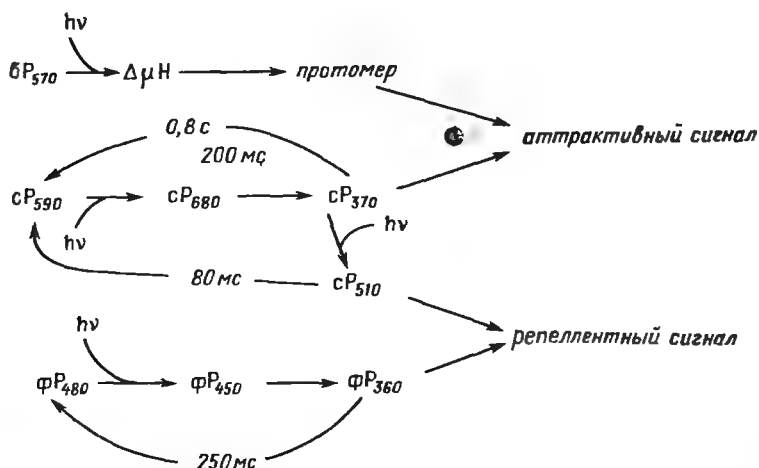


Рис. 45. Схема функционирования бактериородопсина (bR), сенсорного родопсина (sR) и фобородопсина (fR) в фотосенсорной системе галобактерий (Скулачев, 1988)

Механизм работы этих белков в настоящее время полностью не известен. В. П. Скулачев предполагает наличие особой $\Delta\mu\text{H}^+$ -сенсорной системы, названной им *протомером*, которая передает сигнал «моторам» жгутиков (рис. 45). Все эти белки имеют характерные максимумы поглощения и различный сдвиг максимума в ответ на действие света.

ВОПРОСЫ

1. Какие свойства бактериородопсина позволили с высокой точностью установить структуру его упаковки в мембране?
2. Опишите эксперименты, позволившие с помощью моноклональных антител определить локализацию отдельных фрагментов бактериородопсина в мембране.
3. Как происходит генерация $\Delta\mu\text{H}^+$ в мембранах пурпурных бляшек?
4. Какими особенностями обладают липиды пурпурных бляшек? Почему?
5. Какие еще виды бактериородопсина Вы знаете? Опишите их функции.

IV.3. ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ

Дыхательная цепь — это последовательная цепь ферментов, осуществляющая перенос атомов водорода и электронов от окисляемых субстратов к молекулярному кислороду. В дыхательной цепи реализуется электрохимическая разность потенциалов, созданная на мембране первичными генераторами $\Delta\mu\text{H}^+$, в синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата. У животных этот процесс осуществляется в результате окисления субстратов белками дыхательной цепи, у растений — при переносе электрона хлорофилла, возбужденного квантом света, к воде.

Дыхательное фосфорилирование было открыто в начале тридцатых годов В. А. Энгельгардтом. Позднее были обнаружены дыхательные цепи. Было показано, что существуют дыхательные цепи, сопряженные и несопряженные с трансформацией энергии. В этом разделе мы рассмотрим дыхательную цепь, сопряженную с трансформацией энергии. В клетках эукариотов дыхательная цепь расположена во внутренней мембране митохондрий; у дышащих бактерий — в цитоплазматической мембране и в специализированных мембранных структурах — мезосомах или тилакоидах. Дыхательная цепь включает четыре ферментных комплекса, катализирующих окисление НАДН кислородом: НАДН-СоQ-редуктазу (комплекс I), сукцинат-СоQ-редуктазу (комплекс II), СоQH₂-цитохром-*c*-редуктазу (комплекс *bc*₁, или комплекс III) и цитохромоксидазу (комплекс IV) (рис. 46).

Реакции переноса электронов в дыхательной цепи начинаются окислением НАДН на комплексе I. В этом процессе участвуют флавиномононуклеотид (см. рис. 46) и так называемые негемовые

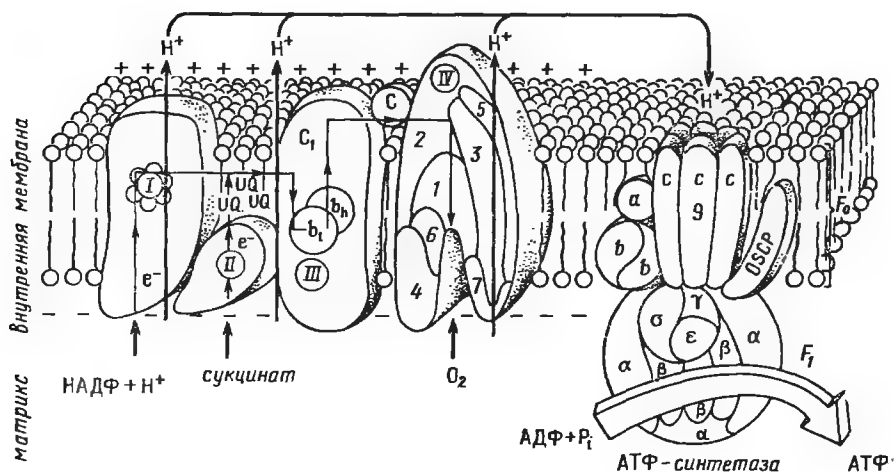
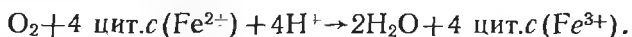


Рис. 46. Дыхательная цепь (объяснения см. в тексте)

железосерные кластеры, в активных центрах которых содержатся негемовое железо и лабильная сера (кластеры имеют обозначения FeS_1I_a , FeS_1I_b , $\text{FeS}_1\text{2}$, $\text{FeS}_1\text{3}$ и $\text{FeS}_1\text{4}$) (см. рис. 46). Полученный в результате восстановления НАДН-СoQ-редуктазой восстановленный коэнзим Q окисляется системой III, в активном центре которой находятся негемовый железосерный кластер FeS_{III} и два гема цитохрома *b*: высокопотенциальный (b_h) и низкопотенциальный (b_l). Далее электроны поступают на цитохром c_1 , а затем на цитохром *c*. Цитохром *c* восстанавливает терминальный ферментный комплекс (IV) электрон-транспортной цепи — цитохромоксидазу (цитохром-*c*-оксидаза, цитохром aa_3). На цитохромоксидазе, открытой О. Варбургом еще в 20-е годы и названной дыхательным ферментом, происходит восстановление кислорода до воды и окисление цитохрома *c*:



Цитохромоксидаза — мембранный белок, состоящий из ряда субъединиц. Интересно, что в процессе эволюции шло усложнение этого комплекса. Цитохромоксидазы различных бактерий содержат от 2 до 3 субъединиц, в митохондриях дрожжей их — 7—8, а в митохондриях высших животных — 12—13 субъединиц.

В активном центре цитохромоксидаз высших животных содержатся два гема *a* (см. рис. 46) и два иона меди. Гемы цитохромоксидазы химически идентичны, но за счет различного окружения имеют разные функциональные и спектральные свойства. Цитохромоксидаза — протонный насос. При транспорте одного электрона происходит перенос двух протонов, один из которых используется при восстановлении кислорода до воды в активном центре комплекса, а другой пересекает мембрану. Терминальная оксидаза ряда бактерий отличается от цитохромоксидазы митохондрий. Так, например, у *E. coli* она состоит из четырех полипептидов, двух гемов типа *b* (b_{558} и b_{563}) и двух ионов меди. Этот фермент окисляет не цитохром *c*, а восстановленный коэнзим Q.

Весь процесс окисления НАДН в дыхательной цепи сопряжен с переносом 10 H^+ с внутренней стороны мембраны наружу. В этом процессе участвуют комплексы I, III и IV, являясь, таким образом, первичными генераторами $\Delta\mu\text{H}^+$. Комплекс II переносит водород от сукцината на коэнзим Q, включая электронтранспортную цепь без участия НАДН. Этот комплекс не принимает непосредственного участия в преобразовании энергии.

IV.3.1. Н-АТФ-синтетаза

Энергия $\Delta\mu\text{H}^+$, образовавшаяся в энергопреобразующих мембранах, реализуется в синтез АТФ ферментом, называемым Н-АТФ-синтетазой. Этот

фермент массой около 500 000 имеет весьма сходную структуру в клетках бактерий и мембранах митохондрий. Первичная структура всех субъединиц Н-АТФ-синтетазы установлена полностью для *E. coli*. Ф. Гибсоном было показано, что гены, кодирующие субъединицы Н-АТФ-синтетазы *E. coli*, образуют специальный оперон (*atp*, или *unc*), нуклеотидная последовательность которого была полностью определена Д. Уолкером и М. Фумай. На основании нуклеотидной последовательности кДНК соответствующих мРНК структурных генов *unc*-оперона и была установлена аминокислотная последовательность всех субъединиц Н-АТФазы *E. coli*. Этим методом в настоящее время установлена структура целого ряда мембранных белков.

Все Н-АТФ-синтетазы состоят из двух частей: водорастворимой каталитической части (F_1) и мембранной части (F_0). F_1 может в изолированном состоянии работать как АТФаза, F_0 обладает способностью «проводить» протоны через мембрану. Преобразовывать $\Delta\mu H^+$ в синтез АТФ может только полный $F_1 + F_0$ -комплекс. Фактор F_1 состоит из 5 типов субъединиц, обозначаемых греческими буквами: α , β , γ , δ , ϵ . При этом в комплекс F_1 входит по три α и β субъединицы и по одной — γ , δ и ϵ . (См. раздел III.3.2.)

Фактор F_0 содержит 3 типа субъединицы: a , b и c . В состав комплекса входит одна субъединица a , две — b и, по данным различных авторов, от 6 до 15 субъединиц c . Анализ генов, кодирующих субъединицы Н-АТФ-синтетазы *E. coli*, предполагает наличие еще одной субъединицы, обозначаемой l . В мембранах митохондрий Н-АТФ-синтетаза содержит, по крайней мере, 5 полипептидов, отсутствующих у бактерий. Сравнительно недавно была определена аминокислотная последовательность одного из них, так называемого «белка, определяющего чувствительность к олигомицину» (oligomycin sensitivity conferring protein — *osc*p). По аминокислотному составу этот белок оказался гомологичным δ -субъединице *E. coli*, но имеет несколько большую массу, причем его N-конец содержит гидрофильный участок, гомологичный не δ -, а β -субъединице *E. coli* (см. рис. 46).

Сравнительный компьютерный анализ последовательностей аминокислот субъединиц, составляющий F_0 и F_1 -комплексы Н-АТФ-синтетазы, показал, что наиболее консервативны последовательности аминокислот, образующие гидрофобные «столбы» F_0 -фактора и входящие в каталитический центр F_1 -комплекса, а субъединицы, выполняющие вспомогательную роль в функционировании комплекса, имеют более вариабельный состав у животных различного эволюционного уровня.

Представления о механизме функционирования Н-АТФ-синтетазы сформулированы на основании данных, полученных Я. Кагавой. Он показал, что каталитический центр локализован в β -субъединице, а в α -субъединице находится центр связывания АТФ, который играет роль аллостерического регулятора. Комплекс $\gamma\delta\epsilon$ взаимодействует с F_0 , закрывая путь протонам.

Таким образом, Я. Кагава предложил рассматривать Н-АТФ-синтетазу как комплекс трех основных функциональных компонентов: энергетического трансформатора (3 субъединицы α и 3 субъединицы β), «ворот», открывающих протонный канал ($\gamma\delta\epsilon$), и сам протонный канал, образованный F_0 -комплексом (субъединицы a , b и c).

Трехмерная структура Н-АТФ-синтетазы исследовалась с помощью электронной микроскопии. Комплекс так велик, что на вывернутых субмитохондрияльных везикулах отчетливо виден в форме грибовидных образований диаметром около 9 нм. Э. Раке-ру удалось «стряхнуть» комплекс с мембранных пузырьков в результате сильного механического перемешивания суспензии. В этом случае в мембранах появляется протонная проводимость, осуществляемая F_0 -комплексом, а в супернатанте — АТФазная активность F_1 -части Н-АТФ-синтетазы.

С помощью метода рентгеноструктурного анализа показано, что F_1 -фактор представляет эллипсоид с осями $12 \times 9 \times 7$ нм. Как происходит соединение его с F_0 -фактором, неясно. Электронно-микроскопическое исследование и компьютерный расчет показали, что α - и β -субъединицы упакованы в два слоя по три субъединицы в каждом. В центре комплекса локализована еще одна белковая группа из остальных трех субъединиц. Считается, что F_1 -фактор крепится к мембране «ножкой» длиной 4,5—5 нм. Однако некоторые авторы полагают, что «ножка» может быть артефактом, возникающим при фиксации мембран для электронно-микроскопического анализа, а «якорем» для F_1 -комплекса служит β -субъединица, для которой продемонстрирована возможность взаимодействия с липидным бислоем.

Рентгеноструктурный анализ комплекса F_0 затруднен, так как этот белок в отличие от бактериородопсина не образует кристаллических структур *in vivo*. Считается, что b -субъединица пересекает мембрану один раз, c — два раза, а a образует шесть α -спиральных «столбов», пронизывающих мембрану. Эта схема основана в основном на анализе чередования гидрофобных и гидрофильных последовательностей в первичной структуре субъединиц и нуждается в экспериментальном доказательстве.

Фактор F_1 способен связывать шесть молекул АТФ по одной на каждую из α - и β -субъединиц. При этом 3 места связывания быстро обменивают нуклеотиды, а три — медленно, поэтому предполагается наличие двух типов мест связывания АТФ. Показано, что, когда заполняется одно место связывания, гидролиз АТФ идет медленно, когда же заполняется второе место связывания, происходит резкое ускорение гидролиза АТФ, по-видимому, за счет возрастания скорости освобождения продуктов гидролиза из активного центра (Виноградов, 1987).

Было показано, что гидролиз АТФ тормозится АДФ, при этом АДФ связывается вне каталитического центра F_1 -фактора и эффективно удаляется приложением к мембране $\Delta\mu\text{H}^+$. Ту же функцию ингибирования гидролиза АТФ F_1 -фактором в митохондриях

может выполнять специальный белковый ингибитор. Таким образом, в клетке существуют механизмы, эффективно регулирующие обратимость работы F_1 -фактора.

Механизм транспорта протона через мембрану F_0 -фактором в настоящее время неясен. С помощью направленных мутаций удалось изменить структуру субъединицы F_0 *E. coli*. Оказалось, что дефект в любой из субъединиц приводит к потере способности транспортировать ионы через мембрану. На основе исследования кинетики переноса ионов фактором F_0 через мембрану Я. Кагава сделал заключение, что F_0 -фактор не просто «канал» для протонов, а место, где происходит их связывание. Предполагается, что в активном центре переноса расположен остаток дикарбоновой аминокислоты *c*-субъединицы. Для *E. coli* это Asp-61. Замена его на какую-либо другую аминокислоту полностью блокирует транспорт H^+ и синтез АТФ за счет $\Delta\mu H^+$.

В настоящее время идет активное исследование механизма переноса протона. При этом успешно используются методы генной инженерии, позволяющие получить направленные изменения в аминокислотном составе субъединиц F_0 -фактора бактерий.

Н-АТФаза была реконструирована Я. Кагавой и Э. Ракером в протеолипосомы. Механизм генерации $\Delta\mu H^+$ и синтез АТФ в этих протеолипосомах были подробно изучены. Было показано, что комплекс $F_0 + F_1$ может синтезировать АТФ в реконструированной системе при генерации на мембране $\Delta\mu H^+$. При этом эффективность синтеза не зависит от природы первичного генератора $\Delta\mu H^+$. В моделях по реконструкции мембранных белков была выявлена возможность сборки молекулярных машин из элементарных деталей, принадлежащих представителям разных животных царств. Так, например, в одной из работ Э. Ракер и В. Стокениус реконструировали протеолипосомы, способные эффективно осуществлять фосфорилирование, где в качестве $\Delta\mu H^+$ генератора использовались бактериородопсин, Н-АТФ-синтетаза из митохондрий сердца быка и фосфолипиды соевых бобов.

Принципы функционирования Н-АТФ-синтетазы В. П. Скулачев формулирует в виде четырех основных положений.

1. АДФ и фосфат при взаимодействии с фактором F_1 могут образовывать АТФ, связанный с активным центром комплекса, причем для этого не требуется притока какой-либо энергии извне.

2. Дополнительная энергия требуется для переноса связанного АТФ из активного центра фактора F_1 в водную среду или для переноса АТФ и фосфата из водной среды в активный центр, т. е. для антипорта АТФ/(АДФ+фосфат) между активным центром и водой.

3. Энергия должна быть в форме $\Delta\mu H^+$, причем $\Delta\psi$ и ΔpH эквивалентны в качестве энергетического ресурса. Электрохимический потенциал при этом может быть создан любым путем, как с помощью первичных $\Delta\mu H^+$ -генераторов различного типа, так и искусственно.

4. Для синтеза АТФ необходим перенос протонов через мембрану, который осуществляется фактором F_0 (Скулачев, 1988).

Таким образом, в общем случае энергопреобразующие мембраны, как правило, сначала генерируют $\Delta\mu H^+$, а затем реализуют его через Н-АТФ-синтетазу в синтез АТФ.

Биоэнергетика мембранных процессов, представляющая в настоящее время достаточно самостоятельную ветвь биомембранологии, бурно развивается. Объем данного учебного пособия не позволяет более подробно описать ряд механизмов трансформации энергии. Исчерпывающая информация по современному состоянию проблем трансформации энергии в биологических мембранах может быть получена из книги В. П. Скулачева «Энергетика биологических мембран» (1989).

ВОПРОСЫ

1. *Какие виды энергии и как преобразовываются в клетке? Для каких энергетических процессов необходимы мембранные структуры, а для каких — нет? Приведите конкретные примеры.*
2. *Сравните три мембранных белка: Na, K -АТФазу, бактериородопсин, Н-АТФ-синтетазу. В чем состоят их общие свойства (включая механизм функционирования), в чем принципиальные различия?*
3. *Как работает дыхательная цепь?*
4. *Какие условия необходимы для синтеза АТФ, на каких субъединицах Н-АТФ-синтетазы эти условия реализуются?*
5. *Что можно сказать об изменении белков дыхательной цепи в ходе эволюции?*

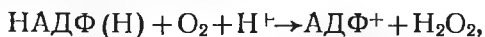
Глава V. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ СИСТЕМА МИКРОСОМНОГО ОКИСЛЕНИЯ

В мембранах эндоплазматического ретикулума практически всех клеток локализована система монооксигеназного окисления, обладающая смешанными функциями и низкой специфичностью. Эта система была впервые обнаружена в 1950 г. в клетках печени, где она наиболее интенсивно развита, а ее основной компонент, цитохром *P*-450 (цит. *P*-450), названный так за характерный спектр поглощения восстановленного комплекса с СО в области 450 нм, был выделен и изучен в середине 70-х годов. В клетках некоторых тканей (например, кора надпочечников) монооксигеназная система локализована в мембранах митохондрий.

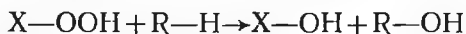
В микросомной системе окисления проходит метаболизм стероидных гормонов, липидов (в том числе ферментативное перекисное окисление полиненасыщенных ацильных цепей мембранных фосфолипидов), а также различных гидрофобных ядов, лекарств, канцерогенных веществ.

Полиспецифичность микросомного окисления объясняется свойствами основного компонента монооксигеназной системы цит. *P*-450, функционирующего в виде различных изоформ. Изоформы цит. *P*-450 — гемопротенины. Они имеют общее строение активного центра, содержащего гемовое железо.

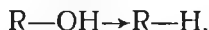
Энзиматическая активность микросомной системы зависит от типа молекул-субстратов. Цит. *P*-450 могут выступать в роли оксидаз:



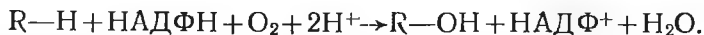
пероксидаз:



и редуктаз (в анаэробных условиях):



Однако наиболее типичная ферментативная активность данной системы — окисление липофильных субстратов, осуществляемое с помощью активации молекулярного кислорода (*монооксигеназные реакции*):



Необходимые кофакторы микросомного окисления — восстановленные нуклеотиды (НАДФН и НАДН), которые взаимодействуют с цит. *P*-450 через флавопротеин-НАДФН-цитохром *P*-450-

редуктазу. В ряде реакций необходим микросомный гемопротеид цит. θ_5 и флавопротеин-цит.- θ_5 -редуктаза. Кроме этого для некоторых монооксигеназных реакций требуется электронно-транспортная цепь, состоящая из флавопротеина и мембранного сульфопро-теина (путидаредоксин, адренодоксин).

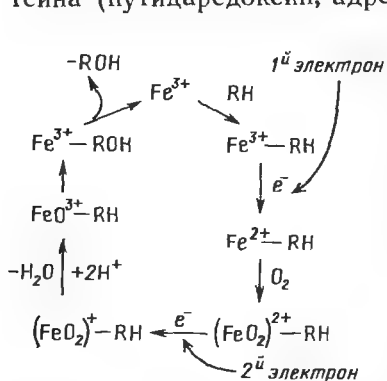


Рис. 47. Транспорт электронов при монооксигеназном окислении

Несмотря на различную ферментную специфичность во всех реакциях, цит. $P-450$ получает электроны от флавопротеина (микросомы) или ферродоксина (митохондрии, бактерии). Схематично реакционный цикл представлен на рис. 47. Центральную роль в процессе активации играет атом железа активного центра цитохрома.

Окисление гидрофобных субстратов в микросомах идет по трем основным путям: 1) включение атома кислорода в связь между атомом водорода и каким-либо другим атомом молекулы-субстрата (реакция гидроксилирования), 2) добавление дополнительного атома кислорода в π -связь (эпоксидирование), 3) присоединение атома кислорода в молекулу к паре свободных электронов (окисление). Таким образом, за счет этих реакций осуществляются гидроксилирование алифатических и ароматических соединений, O - и N -деалкилирование, окисление первичных и вторичных аминов, образование сульфоксидов и N -оксидов.

У.И. ИЗОФОРМЫ ЦИТОХРОМА $P-450$

Из сказанного выше видно, что цит. $P-450$ обладает потенциальными возможностями катализировать разнообразные реакции. Это разнообразие каталитических реакций связано с наличием большого количества изоформы цит. $P-450$. К настоящему времени из тканей животных различных видов, простейших и растений выделено более 80 различных изоформ этого фермента. Наиболее полно изучены мультиплетные формы цит. $P-450$ в печени крысы. Выделено и охарактеризовано около 20 изоформ. По-видимому, в мембранах эндоплазматического ретикулума печени и других видов животных содержится примерно такое же количество различных изоформ цит. $P-450$.

Получена кДНК и установлена первичная структура ряда изоформ цит. $P-450$. Было показано, что цит. $P-450$ кодируется семейством «супергенов», которое составляет по крайней мере 50 генов, организованных в несколько (не менее 9) мультигенных семейств. Эти семейства содержат от одного до нескольких ген-

ных сегментов, кодирующих весьма родственные белки (или, по крайней мере, их мРНК). Родственные гены каждого семейства, кодирующие изоформы цит. *P-450*, найдены у животных самых различных видов и человека. В настоящее время ряд изоформ цит. *P-450* получены в чистом виде с помощью методов генной и белковой инженерии.

Все разнообразие изоформ цит. *P-450* можно классифицировать, исходя из трех критериев: 1) распределения по тканям, 2) локализации во внутриклеточных мембранных структурах, 3) типа каталитической активности. В настоящее время изоформы цит. *P-450* обнаружены кроме печени в таких тканях, как почки, легкие, селезенка, кожа, форменные элементы крови (кроме безъядерных эритроцитов). Цит. *P-450* содержится в ряде тканей растений. Уже упоминалось, что цит. *P-450* локализован в мембранах эндоплазматического ретикулума, а в некоторых тканях — в мембранах митохондрий. Не удалось обнаружить изоформы цит. *P-450* в ядерной мембране и в цитозоле некоторых клеток. В растворенном виде цит. *P-450* присутствует в цитоплазме простейших (*Pseudomonas putida*).

Изучение изоформ цит. *P-450* в тканях животных различных видов позволяет проследить эволюцию мембранных белков. Переход от простейших к более развитым животным требует «усовершенствования метаболизма», обеспечивающегося за счет встраивания ферментов в мембранные структуры, образования мультиферментных комплексов, появления новых изоформ. Эти процессы обеспечивают более высокую специфичность и тонкую регуляцию реакций метаболизма (см. гл. IV. 1).

При классификации изоформ цит. *P-450* по их каталитической активности учитывается тип субстрата: во-первых, такие эндогенные соединения, как холестерин, стероиды, липорастворимые витамины (гидроксирование витамина D, участие в метаболизме витамина A), простагландины и жирные кислоты (ω - и ω -1-гидроксирование), а во-вторых, экзогенные субстраты (ксенобиотики) — практически все гидрофобные загрязнители окружающей среды, канцерогены, различные лекарственные препараты, пестициды, инсектициды и т. п. Определенные изоформы цит. *P-450* участвуют и в метаболизме таких низкомолекулярных соединений, как этанол и ацетон.

В настоящее время нет единой классификации изоформ цит. *P-450*. Изоферменты, полученные из печени кролика, обозначаются прописными буквами (например, *P-450 LM*), цитохром из печени крыс — строчными (цит. *P-450_a*, *P-450_b*, *P-450_c*), иногда в обозначении используется аббревиатура субстратов. Следует обратить внимание на две группы цитохромов. Первая группа — ферменты, локализованные в тканях, активно участвующих в метаболизме гормонов (кора надпочечников, плацента, половые клетки). К этой группе относятся как микросомные, так и митохондриальные белки, которые включаются в метаболизм, например, стероидов: цит. *P-450* (осуществляет ароматизацию андро-

генов в эстрогены); $P-450_{11\beta}$ (11β -гидроксилирование дезоксикортизона); $P-450_{17\alpha}$ (17α -гидроксилирование прогестерона). Вторая группа — гемопротеиды микросом, среди которых есть как изоферменты, осуществляющие метаболизм эндогенных субстратов (например, гидроксилирование тестостерона и андростандиона), так и изоформы цит. $P-450$, метаболизирующие экзогенные соединения (ксенобиотики).

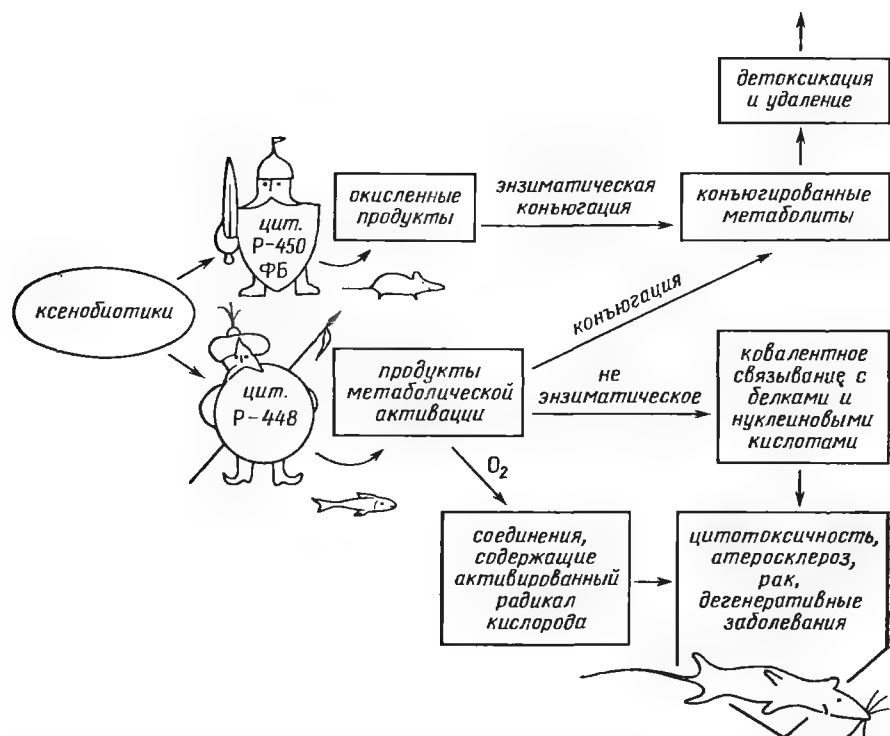


Рис. 48. Схема участия цитохромов, индуцируемых фенобарбиталом, и цитохромов $P-448$ в детоксикации и метаболической активации ксенобиотиков

Вызывает удивление полиспецифичность последней группы изоформ цит. $P-450$, которая способна метаболизировать не только существующие в природе гидрофобные ксенобиотики (такие, как, например, бенз(а)пирен и его производные), но и практически все липофильные искусственно синтезированные соединения: лекарства, пестициды и гербициды, полихлорированные бифенилы и т. п. Эта полиспецифичность позволила высказать предположение, что изоформы цит. $P-450$ могут синтезироваться после проникновения в организм новых низкомолекулярных соединений, подобно тому как синтезируются специфические антитела в ответ

на попадание в организм антигенов. Однако в настоящее время механизм запуска синтеза изоформ цит. *P-450* изучен недостаточно полно, пока эта гипотеза не находит экспериментального подтверждения. В микросомах печени крыс, по-видимому, как уже отмечалось выше, содержится не более 20 изоформ цит. *P-450*.

Изоферменты, осуществляющие метаболизм ксенобиотиков, можно разделить на две основные группы (суперсемейства). В группу цит. *P-448* (цит. *P-450_c* для микросом печени крыс) входят изоформы цитохрома, осуществляющие метаболизм липофильных ксенобиотиков. К ним относятся полициклические углеводороды, такие, например, как бенз(а)пирен и метилхолантрен, а также некоторые полихлорированные бифенилы. Активность этих монооксигеназ возрастает в ответ на введение в организм полициклических углеводов (наиболее сильными индукторами являются 2,2-6,6-диокситетрадиоксин и 3-метилхолантрен). Вторая группа, в отличие от первой, индуцируется фенobarбиталом и, как правило, осуществляет окисление более гидрофильных субстратов (это цит. *P-450_b* и *P-450_e* крыс). Фенobarбитал не индуцирует активности монооксигеназ у рыб, птиц и, по-видимому, у других групп низших животных, что говорит о том, что это субсемейство отсутствует у низших животных (рис. 48). Группа цит. *P-448* представлена практически у всех изученных видов. Цит. *P-450_c* и *P-450_d* соответствуют цит. *LM₆* и *LM₄* кроликов и цит. *P₁-450* и *P₃-450* мышей. Несмотря на то что из микросом печени птиц и рыб различных видов выделены весьма близкие изоферменты, единой номенклатуры этих изоформ нет. Различия между двумя субсемействами цитохромов отражены в табл. 19.

V.1.1. Регуляция активности монооксигеназ

Регуляция активности монооксигеназной системы — очень сложный и комплексный процесс. Увеличение активности изоформ цит. *P-450*, участвующих в метаболизме гормонов, происходит в ответ на изменение гормонального статуса организма и существенно зависит от пола, возраста, периода репродуктивной активности животного. Изоферменты, осуществляющие метаболизм ксенобиотиков, увеличивают свою активность за счет синтеза де novo соответствующих изоферментов в ответ на попадание в организм индуктора. При этом индуктор — не обязательно субстрат микросомного окисления. Уменьшение активности монооксигеназ может быть связано со специфическим и неспецифическим ингибированием изоформ цит. *P-450*, с уменьшением концентрации кофакторов, в первую очередь НАДФ(Н) и НАД(Н). Ингибиторами метаболизма ксенобиотиков в системе монооксигеназ является ряд соединений, имеющих в своей структуре молекулу имидазольного кольца (противогрибковый препарат кетосоназол, лекарство цеметидин и др. вещества). Некоторые химические агенты (амфетамины, антибиотик олеандомицин) в результате мета-

Характеристика семейства цит. Р-450, индуцируемых фенобарбиталом, и семейства цит. Р-448

Свойство	Цит. Р = 450, индуцируемые фенобарбиталом	Цит. Р = 448
Количество изоэнзимов Максимум поглощения в комплексе с СО	по крайней мере 5 450 нм	по крайней мере 3 448 нм
Распределение по тканям	присутствует в большинстве тканей млекопитающих, не определен в плаценте и тканях кишечника; сильно индуцируется в печени, но не в других тканях	присутствует в большинстве тканей, в том числе и в тканях рыб, птиц; индуцируется в легких, почках, кишечнике, селезенке и ряде других тканей, особенно сильно индуцируется в печени и плаценте
Перинатальное развитие (для млекопитающих)	низкий уровень в неонатальный период, увеличивается с возрастом	преобладает в неонатальном, уменьшается в постнатальном
Антигенные свойства	перекрестно реагирует с антителами, полученными к цитохромам своего семейства, но не с антителами к цит. Р-448	перекрестно реагирует с антителами, полученными к цитохромам своего семейства, в том числе и других видов животных, но не с антителами к цит. Р-450, индуцируемому фенобарбиталом
Индукция	основной индуктор фенобарбитал; редуктаза цит. Р - 450 также индуцируется; рецептор для индуктора не обнаружен; более сильная индукция в период неонатального развития	типичный индуктор 3-метилхолантрин; редуктаза не индуцируется; идентифицирован цитозольный рецептор; более сильно индуцируется у взрослых животных
Субстратная специфичность	ограниченная, однако субстратом могут быть как глобулярные, так и планарные молекулы; специфический субстрат 7-пентоксирезорифин метирапон	широкая, но только для планарных молекул; специфический субстрат 7-этоксирезорифин
Специфический ингибитор	не активирует полициклические углеводороды; активирует ароматические амины, амиды, гетероциклические амиды и аминокзосоединения в мутагенах	9-гидроксиметилртитин
Метаболическая активация канцерогенов	рез С- или N-окисления; активирует нитрозамины	активирует полициклические углеводороды, ароматические амины и амиды, гетероциклические амины и аминокзосоединения через смешанное N-окисление в мутагенные и канцерогенные соединения; не активирует нитрозамины
Эндогенные субстраты	гидроксиглирование тестостерона в 16 α -, 16 β - и 17-позициях; гидроксиглирование простагландинов в ω и ω -1 положениях; необходим цит. ϕ_5	гидроксиглирование простагландинов в 1-м и 2-м положениях; не нуждается в цит. ϕ_5

болической активации способны жестко связывать цит. Р-450, полностью ингибируя его активность.

Определенную роль в регуляции активности монооксигеназной системы играют мембранные фосфолипиды. Регуляция активности цит. Р-450 может осуществляться и за счет «разработки» мембран микросомом с помощью индуцируемого цит. Р-450 перекисного окисления фосфолипидов мембран эндоплазматического ретикулула (см. гл. VIII).

Вопросы

1. *Что такое монооксигеназное окисление?*
2. *Чем объясняется полиспецифичность системы монооксигеназного окисления?*
3. *Как функционирует цит. Р-450?*
4. *Как изменялась монооксигеназная система в ходе эволюции?*
5. *Как Вы представляете роль цит. Р-450 в охране «внутренней среды» человека?*

V.2. МИКРОСОМНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЧУЖЕРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Цитохром Р-450 — ключевой фермент в элиминации, детоксикации и метаболической активации экзогенных субстратов. Эти процессы являются важнейшими для поддержания химического гомеостаза внутренней среды животных и человека, играют основную роль в метаболизме лекарств и попадающих в организм химических загрязнителей окружающей среды. Остановимся на этих процессах подробнее.

1. **Элиминация.** Липофильные молекулы с трудом выводятся из биологических мембран, так как образуют гидрофобные связи с молекулами мембранных структур. Окисление определенных групп молекулярным кислородом в результате монооксигеназных реакций приводит к увеличению гидрофильности чужеродных соединений. Это способствует их выведению или ускоряет реакции последующей детоксикации, как правило, с участием ферментов, осуществляющих их конъюгацию с белками, что значительно облегчает выведение этих соединений из организма.

2. **Детоксикация.** Часто химическая модификация в монооксигеназной системе приводит к потере молекулой ее биологической активности, токсичности.

33. **Метаболическая активация.** В этом случае продукт монооксигеназной реакции становится более активным соединением, чем молекула, из которой он образовался. Типичный пример такой реакции — образование в монооксигеназной системе из бенз(а)пирена окисленных производных, способных связываться с ДНК, вызывая мутагенез и канцерогенез. Подобным образом в микросомной системе происходит метаболическая активность целого ряда проканцерогенов, включая *афлотоксины*. Схема участия различных изоформ цит. Р-450 в метаболизме

чужеродных соединений представлена на рис. 48. Метаболизм химических соединений в монооксигеназной системе является ключевым моментом для интерпретации фармакологического и токсического действия. Именно это привлекает внимание к цит. *P-450* не только биохимиков, но и специалистов в области биотехнологии, фармакологии, охраны окружающей среды. Цит. *P-450* — один из наиболее изученных мембранных белков. В настоящее время выделен и очищен ряд изоформ цит. *P-450* из тканей млекопитающих, установлена первичная структура для ряда изоформ цит. *P-450*, осуществлена реконструкция монооксигеназной системы.

Подробно исследованы механизмы транспорта электронов в микросомальных цепях. Тем не менее целый ряд механизмов функционирования монооксигеназной системы остается не выясненным. Например, неясно, как одна молекула НАДФ(Н) цит. *P-450*-редуктазы взаимодействует при переносе электронов более чем с 15 различными изоформами *P-450*, как эти изоформы взаимодействуют друг с другом? На эти и ряд других вопросов должны дать ответ дальнейшие биохимические и физико-химические исследования монооксигеназной системы. Другое, развивающееся в настоящее время направление изучения монооксигеназ — биотехнологическое.

Проводятся попытки детально охарактеризовать гены изоформ цит. *P-450* и с помощью генной инженерии получить гены-химеры, способные, будучи встроенными в простейшие организмы, осуществлять направленный синтез стероидных гормонов и других биологически активных соединений.

Медицинская биохимия активно занимается выяснением генетических механизмов индукции изоформ цит. *P-450* в тканях людей, исследуется роль цит. *P-450* в охране внутренней среды человека. Показана связь монооксигеназной системы с иммунной, участие цит. *P-450* в аллергических реакциях. Метаболизм практически всех гидрофобных загрязнителей природной среды сопряжен с их детоксикацией или с метаболической активацией в системе монооксигеназ. Поэтому на базе цит. *P-450* разрабатываются тест-системы для анализа канцерогенных и мутагенных соединений, биологической индикации различных ксенобиотиков в окружающей среде.

Токсикологический анализ экосистем может быть проведен на основе исследования уровня монооксигеназных активностей в тканях животных, подвергавшихся действию чужеродных соединений — индукторов изоформ цит. *P-450*. С этой целью проводят мониторинг — периодическое исследование активности изоформ цит. *P-450* в печени грызунов, рыб, насекомых.

У людей может быть определена монооксигеназная активность в лимфоцитах. Анализ этих активностей у работников, соприкасающихся с канцерогенными и мутагенными соединениями, позволяет выделить группы риска и провести своевременную профилактику.

ВОПРОСЫ

1. Охарактеризуйте основные компоненты монооксигеназной системы, их функции и роль в метаболизме эндогенных и экзогенных субстратов.
2. Охарактеризуйте основные группы изоформ цит. Р-450. Как регулируется синтез различных изоформ? Приведите примеры других ферментов, имеющих различные изоформы.
3. На каких свойствах цит. Р-450 основаны тест-системы для биомониторинга чужеродных соединений в окружающей среде?
4. В первой группе работников была обнаружена высокая активность бенз(а)пиренгидроксилазной активности лимфоцитов периферической крови, а во второй — низкая. Какую из этих двух групп работников Вы допустите к производству, связанному с синтезом проканцерогенных соединений?
5. Сравните функционирование электрон-транспортной цепи митохондрий и микросом. В чем их сходство и различие?

Глава VI. МЕМБРАННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

VI.1. ПЕРЕДАЧА ИНФОРМАЦИИ В МЕМБРАНАХ

Важное свойство всех живых существ — способность воспринимать, перерабатывать и передавать информацию при помощи биологических мембран. Несмотря на громадное разнообразие различных систем получения и переработки информации, функционирующих в животных и растительных организмах, все они основаны на едином принципе. Процесс получения информации, как правило, начинается с взаимодействия сигнала (химического агента, кванта света, механического воздействия и т. п.) с рецептором — мембранным белком. Следующий этап — передача информации в центр переработки с помощью вторичных мессенджеров (посредников). В ответ на получение сигнала происходит биохимическая модификация специализированных молекул-эффекторов, через которых и формируется ответ биологической системы (рис. 49).

Именно по такому принципу функционируют нервная, гормональная и иммунная системы животных, на такие же стадии могут быть разложены и фотобиологические процессы, протекающие как в организмах животных, так и в растениях. Общий принцип действия всех систем приема и передачи информации — не только химическая модификация мембранных белков, но и изменение концентрации заряженных ионов внутри и вне клетки, формирование трансмембранного потенциала. В последнее время выяснилось, что этот процесс играет важную физиологическую роль не только в нервной ткани, но и при переработке информации в тромбоцитах, лимфоцитах, тучных клетках.

Первым компонентом в схеме, представленной на рис. 49, является рецептор. Рецептор, как правило, интегральный блок. На поверхности мембраны он имеет своеобразное «приемное устройство», способное распознавать сигнал и взаимодействовать с ним. При этом сам сигнал, будь это химическое вещество или квант света, или даже механическое воздействие, обычно не проникает внутрь клетки, а преобразуется в результате модификации мембранных белков, которая приводит к активации молекул посредников — вторичных мессенджеров.

В общем виде передача сигнала через мембрану может быть сведена к трем основным стадиям: I — взаимодействие рецептора с сигналом, II — конформационная перестройка и изменение функции специализированных мембранных белков — посредников, III — активация «вторичных мессенджеров» — сравнительно не-

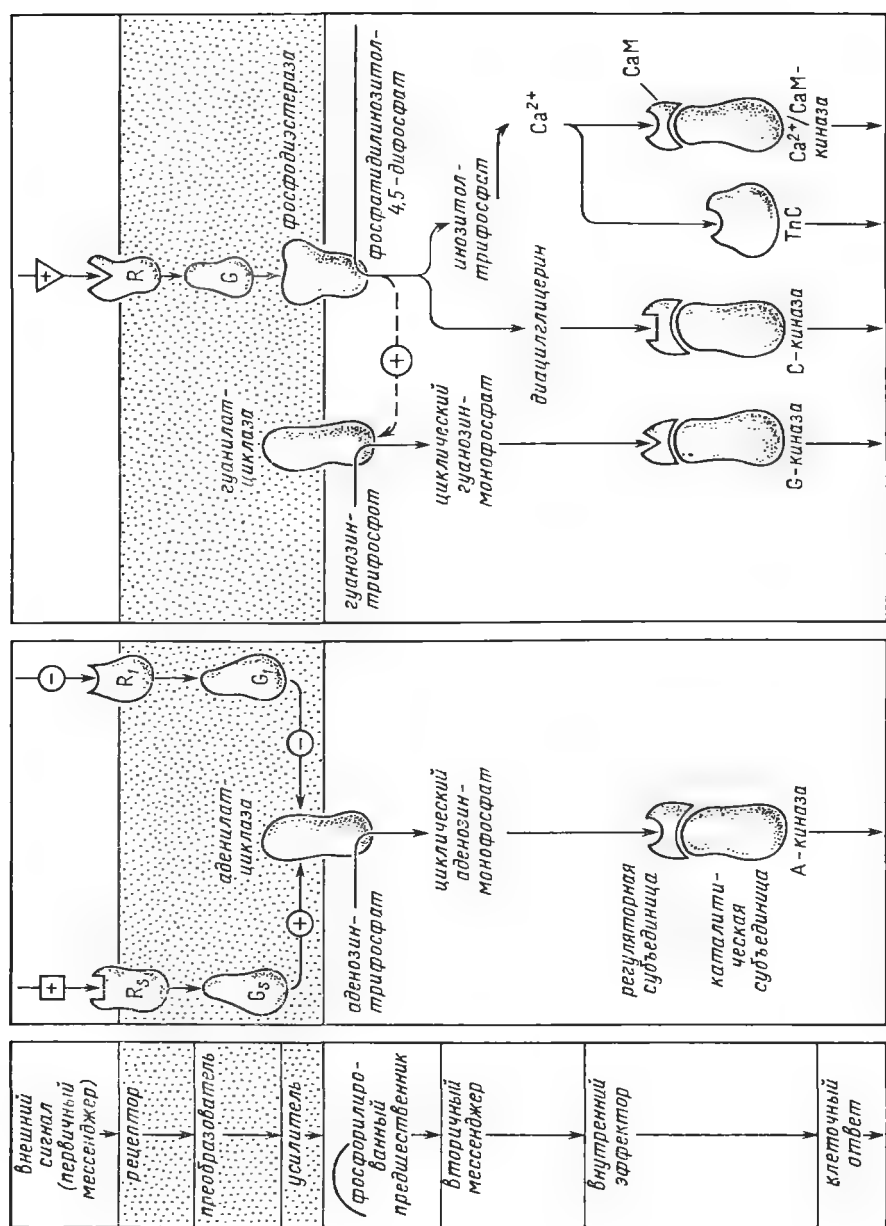


Рис. 49. Схема трансмембранной передачи сигнала в клетке

больших молекул и ионов, диффузия которых в клетке к определенным субклеточным структурам обеспечивает стремительное распространение сигнала. Механизмы передачи информации в живых системах так же универсальны, как передача генетического кода или трансформация энергии (см. гл. IV). Все громадное разнообразие сигналов, полученное различными рецепторами, преобразуется по единым механизмам за счет идентичности II и III стадий передачи информации через мембрану.

В этом разделе мы рассмотрим общие механизмы передачи информации. Механизмы взаимодействия сигнала и рецептора, а также формирование клеточного ответа в результате действия вторичных мессенджеров будут проанализированы ниже.

VI.1.1. G-белки и вторичные мессенджеры

От первого звена рецептора сигнал поступает на так называемые *N*- или *G*-белки — мембранные белки, активирующиеся при связывании гуанозинтрифосфата (ГТФ). *G*-белки способны передавать информацию «усилительному» ферменту, который, функционируя на внутренней стороне мембраны, активирует *вторичные мессенджеры*. Роль вторичных мессенджеров выполняет небольшое число молекул. В настоящий момент известно всего лишь два пути передачи сигнала, отличающихся по участию различных вторичных мессенджеров. В первом случае это циклический аденозинмонофосфат (цАМФ). В другом действует комбинация трех вторичных мессенджеров: Ca^{2+} , инозитолтрифосфата и диацилглицерина. При этом два последних вещества образуются из мембранных фосфолипидов. Активация вторичных мессенджеров, как правило, связана с химическими реакциями переноса и рекомбинации фосфатных групп. Предшественники вторичных мессендже-

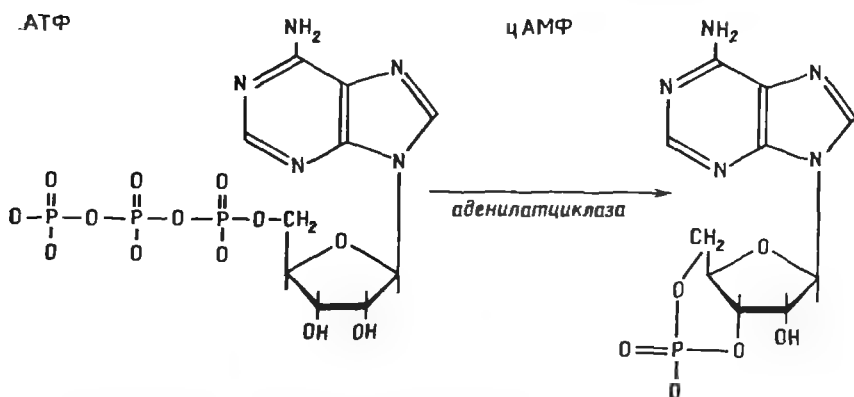
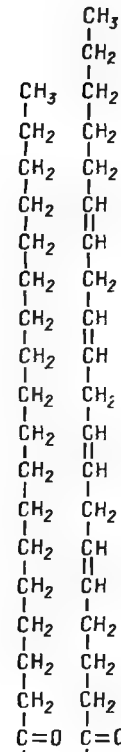
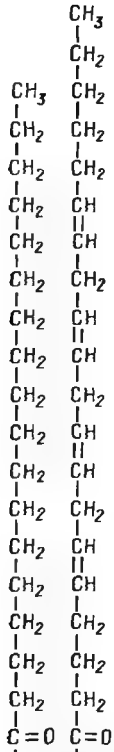


Рис. 50. Химическая структура идентифицированных вторичных мессенджеров: а — цАМФ, б — инозитолтрифосфат

PIP₂

DG ~



ссах — митохондриальная липидная липаза

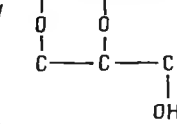
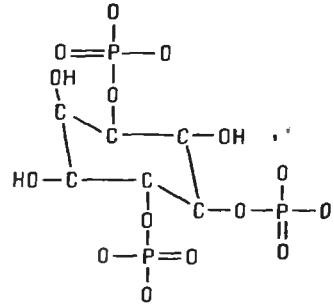
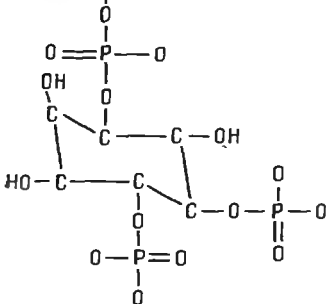
IP₃

Рис. 50

ров — высокофосфорилированные соединения. Так, например, усилительный фермент аденилатциклаза превращает аденозинтрифосфат в цАМФ, а другой усилительный фермент — фосфолипаза С (или фосфодиэстераза) — расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат на диацилглицерин и инозитолтрифосфат (подробнее эти реакции будут описаны ниже) (рис. 49, 50).

Несмотря на то что цАМФ был открыт еще в 1958 г. Т. Роллом и Э. Сазерлендом (младшим), первой ступенью исследования трансмембранной передачи сигнала, пожалуй, следует считать работы М. Родбелла, выполненные совместно с группой исследователей из Национального института здоровья (США) в 1971 г. Было продемонстрировано, что при передаче сигнала образуется цАМФ из АТФ и что при этом необходим ГТФ. В этих же экспериментах было показано, что после взаимодействия рецептора с лигандом G-белок активируется молекулой ГТФ и что этот процесс происходит на внутренней стороне мембраны.

Позднее было показано, что G-белки образуют две группы: G-стимулирующие белки (G_s) и G-ингибирующие белки (G_i); G_s -белки связаны со стимулирующими рецепторами (R_s), а G_i -белки — с ингибирующими рецепторами (R_i). Взаимодействие сигнала с рецептором приводит к изменению конформации рецептора. Эта «перестройка» рецептора передается G-белку, он в свою очередь изменяет конформацию и приобретает способность связывать ГТФ. Связывание G-белка цАТФ приводит к его активации, после чего он становится способен взаимодействовать с аденилатциклазой (см. рис. 49). При этом G_s -белки активируют аденилатциклазу, а G_i -белки, наоборот, ингибируют активность аденилатциклазы. Аденилатциклаза осуществляет перевод АТФ в цАМФ (см. рис. 50), при этом две из трех фосфатных групп отделяются, а третий фосфат образует цикл с молекулой рибозы, соединяясь с ней через атомы кислорода.

Канал передачи информации включается при взаимодействии G-белка с ГТФ и этого комплекса с аденилатциклазой. В ответ на это «включение» в клетке увеличивается или уменьшается концентрация вторичного мессенджера цАМФ, в результате чего информация проходит через мембрану.

Активность комплекса G_s -ГТФ подавляется в результате гидролиза ГТФ до ГДФ гуанозинтрифосфатазой. Существуют специфические ингибиторы гуанозинтрифосфатазы. К ним относится токсин, выделяемый холерным вибрионом. Ингибирование холерным токсином этого фермента приводит к увеличению времени жизни комплекса G_s -белка с ГТФ, и клетка начинает производить цАМФ независимо от побуждающих ее к этому сигналов. В клетках кишечника цАМФ вызывает сильную секрецию жидкости, что приводит к тяжелой диаррее, которой страдают больные холерой. Коклюшный токсин, продуцируемый возбудителем коклюша *Bordetella pertussis*, препятствует ингибированию аденилатциклазы G_i -белком, однако роль этого эффекта в течение заболевания коклюшем пока не ясна. Специфическое действие на циклазную сис-

тому оказывают и биологически активные вещества, полученные из растений. Аденилатциклазу активирует *форсколин* — соединение, получаемое из травянистого растения *Coleus forskohlii*. Экстракты этого растения с незапамятных времен используются в индийской народной медицине для лечения заболеваний сердца, органов дыхания, судорог, бессонницы. Таким образом, с помощью токсинов и химических препаратов, вызывающих модуляцию активности циклазной системы, можно добиваться определенного фармакологического эффекта. Токсины и яды, специфически взаимодействующие с рецепторами и компонентами системы, передающими сигналы, служат прекрасным природным инструментом для исследования механизмов восприятия и передачи информации в клетке.

Ряд белков (эффекторов) осуществляет свои функции в результате фосфорилирования цАМФ-зависимыми протеинкиназами. Молекула протеинкиназы состоит из двух субъединиц: регуляторной и каталитической. цАМФ связывается с регуляторной субъединицей, после чего происходят отделение каталитической субъединицы и фосфорилирование соответствующего белка. С другой стороны, цАМФ часто используется в клетке для активации другого вторичного мессенджера — ионов Ca^{2+} . Так, адреналин приводит к повышению концентрации в клетке миокарда цАМФ, которая «открывает» кальциевый канал, а вход в миоцит Ca^{2+} усиливает сокращение сердечной мышцы. Аналогичный механизм обнаружен в ряде мышечных клеток, в секреторных и нервных клетках. Роль кальция как внутриклеточного регулятора была описана в 1883 г. английским физиологом и медиком С. Рингером. Он обнаружил, что Ca^{2+} необходим для сокращения мышечной ткани. В настоящее время Ca^{2+} признан универсальным вторичным мессенджером, участвующим практически во всех регуляторных процессах — от мышечного сокращения и нервного проведения до передачи митогенного стимула в клетках иммунной системы. Низкая концентрация в клетке Ca^{2+} поддерживается низкой проницаемостью биомембран для этого иона и постоянной работой Са-АТФаз (см. гл. III. 2.2). Резкое изменение в клетке концентрации Ca^{2+} происходит за счет специальных кальциевых каналов, которые в ответ на соответствующий стимул (деполяризация, изменение концентрации Ca^{2+} и т. д., см. гл. III.3), открываются и высвобождают Ca^{2+} из внеклеточного пространства или из внутриклеточных депо, которыми служат цистерны эндоплазматического ретикулаума и иногда мембраны митохондрий. Резко увеличить проницаемость мембран для Ca^{2+} в ответ на внешний стимул может не только цАМФ (по-видимому, за счет фосфорилирования определенной субъединицы кальциевого канала), но и гидролиз мембранных липидов (рис. 51).

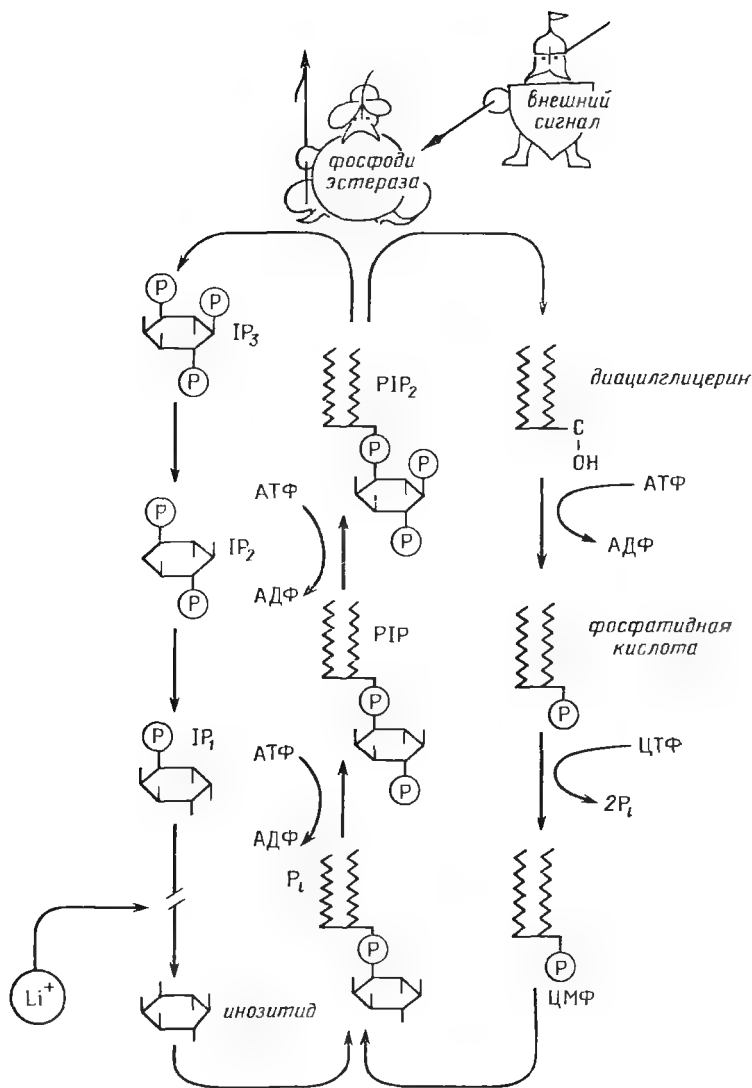


Рис. 51. Цикл фосфолипидов, содержащих инозитол, служащий для возобновления вторичных мессенджеров

VI.1.2. Роль мембранных фосфоинозитидов в передаче сигнала

Второй путь передачи информации, сопряженный с гидролизом мембранных фосфоинозитидов, был открыт довольно давно, но долгое время вызывал сомнение у целого ряда исследователей. Он предполагал активное участие липидов в передаче сигнала, тогда как роль мембранных липидов всегда сводилась только к матриксу биомембран, выполняющему вспомогательные функции в работе мембранных белков. Это открытие сделали в 1953 г. в Монреале Мейбл и Лауэлл Хокин. Они обнаружили, что ацетилхолин вызывает включение ^{32}P в фосфатидилинозитол мембран секреторных клеток поджелудочной железы. Позднее выяснилось, что ацетилхолин приводит к гидролизу мембранных фосфоинозитидов, а включение фосфора связано с синтезом фосфатидилинозита, компенсирующим его убыль под действием ацетилхолина. Дальнейшие работы показали, что целый ряд стимулов, включая свет, приводит к активации обмена мембранных инозитидов. После того как Р. Митчелл (США) обнаружил, что внутриклеточный кальций освобождается из своих депо в ответ на гидролиз фосфатидилинозит-4,5-дифосфата, стало окончательно ясно, что именно в результате метаболизма инозитидов происходит передача сигнала в клетку.

Для того чтобы представить механизм действия *фосфоинозитидов* в качестве вторичных мессенджеров, необходимо более подробно рассмотреть цикл их метаболических превращений в мембране.

Внешний сигнал после взаимодействия с рецептором через G-белок (рис. 52) активирует фосфодиэстеразу (фосфолипазу C), которая гидролизует фосфатидилинозит-4,5-дифосфат (PIP_2) с образованием диацилглицерина и инозиттрифосфата (см. рис. 52). Диацилглицерин фосфорилируется диацилглицеринкиназой в фосфатидную кислоту (реакция требует присутствия АТФ). Фосфатидная кислота взаимодействует с цитидинтрифосфатом и образует цитидиндиацилглицериндифосфат. Это соединение после рекомбинации с инозитом восстанавливает гидролизуемые фосфодиэстеразой фосфоинозитиды. Инозит, необходимый этой реакции, образуется из инозитмонофосфата. Реакция катализируется инозит-1-монофосфатазой, активность которой блокируется ионами лития (см. рис. 52). Именно этим процессом объясняется эффективное лечение ионами лития *маниакально-депрессивных психозов* и некоторых других заболеваний нервной системы. Блокада литием инозит-1-монофосфатазы замедляет синтез в организме инозита и ослабляет протекающие в нейронах процессы, зависящие от метаболизма фосфоинозитидов.

Инозитолтрифосфат вызывает освобождение кальция из мембран эндоплазматического ретикулума, по-видимому, связываясь со специальным рецептором (см. рис. 52). Несмотря на то что процесс выброса кальция из внутриклеточных депо под действием

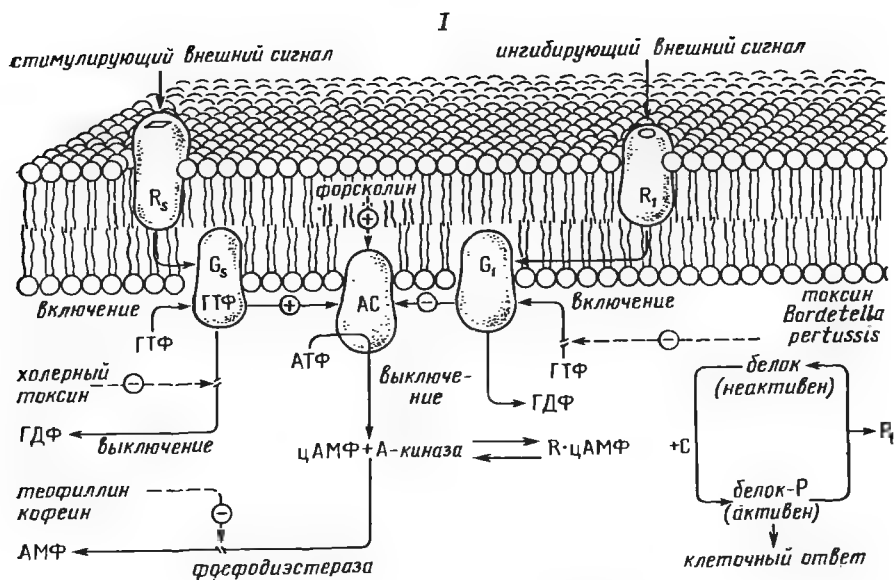


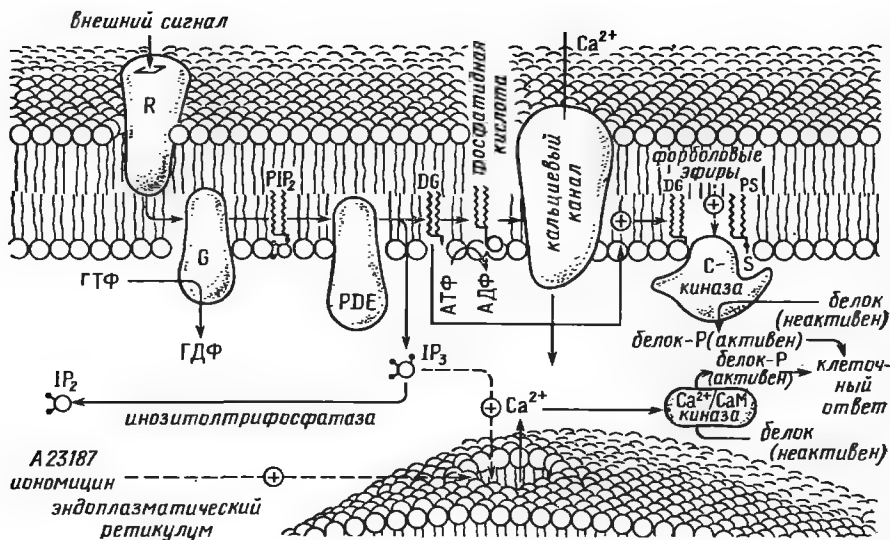
Рис. 52. Пути передачи сигнала. I — путь циклического

фосфоинозитидов обнаружен в целом ряде клеток, механизм, с помощью которого он открывает внутриклеточные кальциевые каналы, окончательно невыяснен. Некоторые процессы, в инициировании которых принимают участие трифосфоинозитиды, приведены

Т а б л и ц а 20

Процессы передачи сигнала, осуществляющиеся с помощью метаболизма фосфоинозитидов (Берридж, 1985)

Внешний сигнал	Ткань	Клеточный ответ
Вазопрессин	печень	распад гликогена
Ацетилхолин	поджелудочная железа	секреция амилазы
Ацетилхолин	гладкие мышцы	сокращение
Ацетилхолин	ооциты (<i>Xenopus</i>)	проницаемость для ионов хлора
Ацетилхолин	β -клетки поджелудочной железы	секреция инсулина
Серотонин	слюнная железа (падальная муха)	секреция жидкости
Тромбин	тромбоциты	агрегация
Антигены	лимфоциты	синтез ДНК
Антигены	тучные клетки	секреция гистамина
Факторы роста	фибробласты	синтез ДНК
Свет	фоторецепторы (<i>Limulus</i>)	преобразование энергии
Сперматозоиды	яйцеклетки (морской еж)	оплодотворение
Тиреотропин-рилизинг-гормон	передняя доля гипофиза	секреция пролактина



аденозинмонофосфата, II — инозитидный путь

в табл. 20. Особый интерес вызывает обмен фосфоинозитидов, стимулируемый в яйцеклетках в момент их развития и оплодотворения, а также в период эмбрионального развития.

VI.1.3. Метаболизм фосфоинозитидов и регуляция проницаемости мембран для ионов Ca^{2+}

Каков же механизм увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , вызываемой гидролизом фосфатидилинозит-4,5-дифосфата на инозитолтрифосфат и диацилглицерин? Следует иметь в виду, что, во-первых, для работы фосфолипазы C необходим ГТФ, т. е. работа рецептора сопрягается через G-белок (Хэслем, Кокро, 1983), а во-вторых, метаболизм фосфолипидов обеспечивает по крайней мере два процесса: индукцию входа кальция в клетку из внешней среды по градиенту концентраций и выход ионов кальция в цитозоль из внутриклеточных депо, т. е., по образному выражению Т. Мичелла, «открываются ворота кальциевых каналов». Механизм работы этих каналов до сих пор не ясен. Высказываются предположения, что Са-канал может быть образован одним из компонентов фосфоинозитидного цикла — фосфатидной кислотой (см. рис. 51, 52).

В модельных системах было показано, что фосфатидная кислота способна транспортировать через искусственные мембраны ионы Ca^{2+} с эффективностью, близкой к действию кальциевого

ионофора А 23187. При этом ионы магния транспортировались значительно более медленно, что говорит о селективности функционирования фосфатидной кислоты в качестве кальциевого ионофора.

Относительно механизма функционирования фосфатидной кислоты в качестве ионофора существует ряд гипотез, ни одна из которых в настоящее время не может быть признана достаточно доказательной. По-видимому, фосфатидная кислота каким-то образом модифицирует структуру липидного бислоя, образуя участки с небислойной упаковкой молекул. При этом на границе бислоя и монослоя образуются «каналы» для ионов кальция. Некоторые исследователи оспаривают физиологическую роль «каналов», образуемых фосфатидной кислотой.

Механизм участия трифосфоинозита в открывании Са-канала не ясен. Однако имеется громадное количество факторов, указывающих на то, что именно под действием трифосфоинозита происходит освобождение Ca^{2+} в физиологически значимых процессах, происходящих в самых разнообразных типах клеток. Трифосфоинозит вызывает освобождение Ca^{2+} в клетках поджелудочной железы, стимулирует мобилизацию запасенного кальция в процессе индуцируемого гормоном поступления глюкозы из печени в кровь. В ооцитах лягушки поток ионов Ca^{2+} увеличивается вдвое в ответ на стимуляцию трифосфоинозитом. Секреция яйцеклеткой гранул, наблюдающаяся сразу после оплодотворения, в результате которой образуется специальный защитный слой (так называемая оболочка оплодотворения), также вызывается ионами кальция, концентрация которых в яйцеклетке резко увеличивается в ответ на внутриклеточную инъекцию трифосфоинозитидов.

В последнее время обсуждается возможность участия трифосфоинозитидов в сопряжении деполяризации плазматических мембран мышц и выброса кальция из ретикулума, приводящего к мышечному сокращению.

По мнению ряда исследователей, в результате передачи сигнала с помощью гидролиза фосфоинозитидов пути передачи информации могут раздваиваться. Это происходит в результате того, что гидролиз фосфатидилинозит-4,5-дифосфата приводит к образованию двух вторичных мессенджеров: трифосфоинозита и диацилглицерина.

Диацилглицерин (ДАГ) претендует на роль вторичного мессенджера, так как он инициирует механизмы, в результате которых активируются два типа протеинкиназ: протеинкиназа С и цГМФ-зависимая киназа. При этом фосфолипаза С играет ключевую роль в процессе переноса сигналов при активации тех рецепторов, которые непосредственно не связаны с аденилатциклазой, а регулируют скорость метаболизма фосфатидилинозитидов.

Вклад каждой из ветвей инозитидного пути передачи сигнала может быть исследован с помощью химических соединений, имитирующих действие одного из двух вторичных мессенджеров, образующихся в результате гидролиза фосфоинозитидов и, следова-

тельно, приводящих в действие механизм одной из ветвей. Действие ДАГ имитируется *форболовыми эфирами*, так как эти соединения вызывают активацию протеинкиназы *C*. Форболовые эфиры — это соединения растительной природы, не присутствующие в животных организмах. Эти вещества выделяются из масла семян восточноазиатского древесного растения *Croton tiglium* и обладают мощным канцерогенным действием — резко ускоряют инициацию опухолей канцерогенами.

Действие трифосфоинозита имитируется кальциевыми ионофорами, среди которых наиболее широко применяется уже упоминавшийся А 23187.

Между двумя путями передачи сигнала через фосфоинозитидный цикл существует синергизм. Так, например, в тромбоцитах форболовый эфир и кальциевый ионофор совместно вызывают такую секрецию серотонина, какую ни одно из этих соединений по отдельности вызвать не может. Форболовый эфир и кальциевый ионофор могут инициировать деление некоторых клеток. Это позволило предположить, что сигнальные пути, связанные с обменом фосфоинозитидов, могут контролировать не только секрецию гормонов, транспорт ионов, но и размножение клеток. Появились экспериментальные доказательства того, что форболовые эфиры способствуют опухолевому росту через активацию «диацилглицериновой ветви» инозитидного сигнального пути. Подробнее об участии фосфоинозитидного цикла в злокачественном перерождении клеток будет описано в главе VIII «Патология биомембран».

VI.1.4. цГМФ — вторичный мессенджер

ГТФ превращается в цГМФ с помощью фермента гуанилатциклазы. В отличие от аденилатциклазы гуанилатциклаза не связана с мембранными рецепторами. Однако образование цГМФ частично сопровождается активацией трифосфоинозитидного цикла, какие-то компоненты которого, по-видимому, вызывают активацию гуанилатциклазы. Известно, что цГМФ активирует так называемые *G*-киназы, вызывающие фосфорилирование определенных белков, физиологическая роль которых пока не установлена. По-видимому, цГМФ может играть роль вторичного мессенджера в клетках нервной ткани. Дж. Трумэн (США) установил, что с помощью цГМФ у насекомых контролируется сложный поведенческий акт освобождения бабочки из кокона. Под действием гормона, выделяемого специальными клетками мозга, в нервных клетках повышается уровень цГМФ, который инициирует сложный комплекс действий, приводящий к освобождению бабочки из куколки.

Ф. Мюрадой было показано, что гормон, секретируемый клетками предсердия, вызывает расслабление гладкой мускулатуры стенок кровеносных сосудов, повышая в них уровень цГМФ.

Предполагается, что цГМФ, действует при посредстве другого вторичного мессенджера — Ca^{2+} . Наиболее хорошо роль цГМФ изучена в механизме передачи сигнала в мембранах зрительных клеток.

Мембранные механизмы приема и передачи сигнала в зрительных клетках будут рассмотрены в следующем разделе.

ВОПРОСЫ

1. На каких основных принципах основаны механизмы передачи информации в клетке?
2. Какие вторичные мессенджеры Вы знаете? Как они функционируют?
3. Как осуществляется трансмембранная передача сигнала через метаболизм фосфоинозитидов?
4. С помощью каких веществ можно имитировать передачу сигнала?
5. Спланируйте эксперимент, в котором с помощью специфических ингибиторов и активаторов различных компонентов, участвующих в передаче сигнала, можно доказать, что вещество А передает сигнал через фосфоинозитидный цикл, а вещество В — через аденилатциклазу.

VI.2. ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА В ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ КЛЕТКАХ СЕТЧАТКИ

Фоторецепторные молекулы в качестве сигнала воспринимают не химический агент, а квант света. Тем не менее принципы передачи сигнала через мембрану у фоторецепторов и рецепторов гормонов весьма сходны. В главе IV (разд. IV.2) был описан механизм работы бактериородопсина. В этом разделе будут изложены принципы работы зрительного родопсина — белка, близкого по упаковке в мембране к бактериородопсину, но выполняющего совершенно другие функции.

Зрительный родопсин локализован у большинства позвоночных в специализированных фоторецепторных клетках двух типов — палочках и колбочках, которые выстилают внутреннюю сторону сетчатки глаза (рис. 53). Палочки функционируют в условиях слабого освещения. Они очень чувствительны и при сильном освещении перегружаются и не могут воспринимать сигналы. При ярком свете зрение обеспечивается колбочками. По-видимому, именно колбочки отвечают за полное объемное изображение, реагируют на разное перемещение предметов. Колбочки передают цветовую гамму изображения. Родопсин — основной белок фоточувствительных мембран палочек, организованных в виде замкнутых дисков (рис. 54).

В колбочках содержатся пигменты, поглощающие в различных областях спектра. У человека различают три вида колбочек, пог-

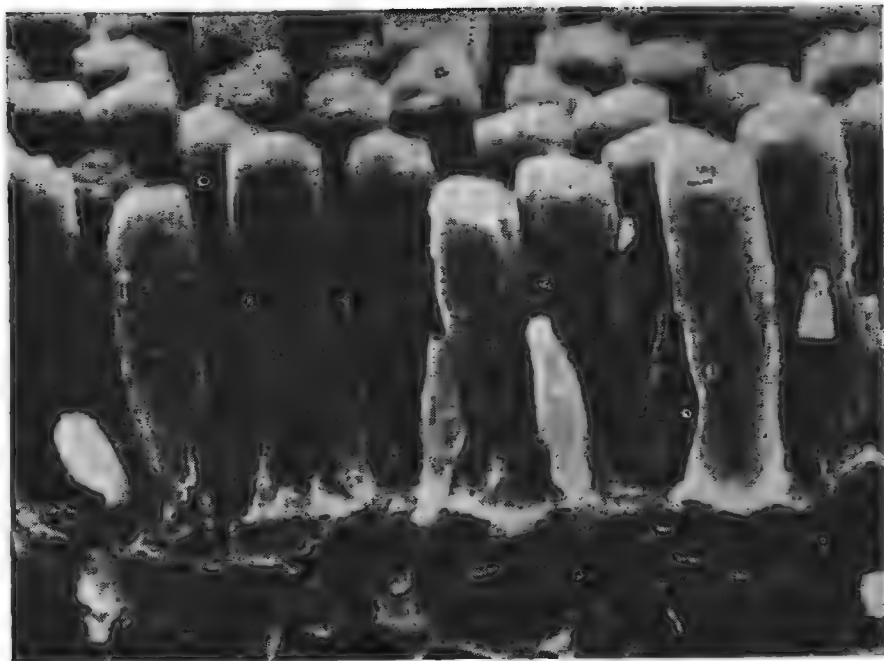


Рис. 53. Колбочки (небольшие на переднем плане) и палочки сетчатки глаза

лощающих свет в коротковолновой, средней и длинноволновой областях видимого спектра световых волн. Именно это различие в пигментах колбочек лежит в основе цветового зрения. При слабом освещении колбочки не принимают сигнал, и мы не воспринимаем цвет объектов. В палочках рецепторная мембрана состоит из замкнутых дисков, не соприкасающихся с цитоплазматической мембраной, а в колбочках фоторецепторная мембрана образует систему складок (см. рис. 54). Таким образом, для передачи сигнала в палочках от диска к плазматической мембране необходим водорастворимый посредник. Как палочки, так и колбочки условно делят на два сегмента: наружный и внутренний. Наружный сегмент содержит фоторецепторные мембраны, а внутренний — специализируется на генерации энергии, содержит аппарат, формирующий молекулы, необходимые для передачи сигнала. Из внутреннего сегмента формируется синаптическое окончание, осуществляющее передачу сигнала к первым волокнам. Наружный сегмент легко отделяется от внутреннего в результате мягкой гомогенизации мембран, что позволяет с помощью дифференциального центрифугирования выделять фоторецепторные мембраны в чистом виде.

Зрительный родопсин, так же как и бактериородопсин, содержит в своем активном центре 11-*цис*-ретиаль. Белковая часть

родопсина без ретиналя называется опсином и функционирует как фермент. Первичные структуры зрительного родопсина и бактериородопсина различны.

Ю. А. Овчинниковым с группой сотрудников в 1982 г. была расшифрована аминокислотная последовательность родопсина. Полипептидная цепь этого белка состоит из 348 аминокислот. Белок имеет две дополнительные олигосахаридные цепи, присоединенные к остаткам аспарагина в положении 2 и 15. Так же как и бактериородопсин, зрительный родопсин имеет 7 участков, состоящих из гидрофобных аминокислот, которые соединены короткими цепями гидрофильных аминокислотных последовательностей. Ретиналь расположен

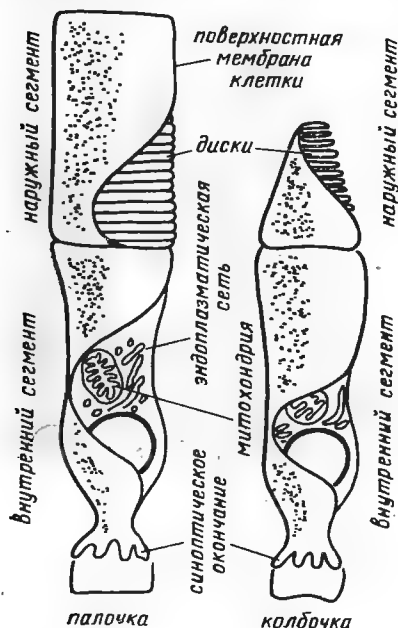


Рис. 54. Строение палочки и колбочки

внутри внешнего сегмента. Ретиналь расположен в пространстве между дисками, содержащими родопсин. Ретиналь имеет форму палочки, которая вставлена в один из концов молекулы родопсина. Ретиналь имеет длину 21 нм, что соответствует длине внешнего сегмента палочки. Ретиналь имеет диаметр 0,5 нм, что соответствует диаметру диска. Ретиналь имеет массу 1,5 · 10⁻²¹ г, что соответствует массе диска. Ретиналь имеет заряд +1, что соответствует заряду родопсина. Ретиналь имеет энергию активации 1,5 эВ, что соответствует энергии активации родопсина. Ретиналь имеет частоту колебаний 1,5 · 10¹⁴ с⁻¹, что соответствует частоте колебаний родопсина. Ретиналь имеет амплитуду колебаний 0,1 нм, что соответствует амплитуде колебаний родопсина. Ретиналь имеет скорость колебаний 1,5 · 10¹⁴ м/с, что соответствует скорости колебаний родопсина. Ретиналь имеет энергию колебаний 1,5 · 10⁻²¹ Дж, что соответствует энергии колебаний родопсина. Ретиналь имеет частоту колебаний 1,5 · 10¹⁴ с⁻¹, что соответствует частоте колебаний родопсина. Ретиналь имеет амплитуду колебаний 0,1 нм, что соответствует амплитуде колебаний родопсина. Ретиналь имеет скорость колебаний 1,5 · 10¹⁴ м/с, что соответствует скорости колебаний родопсина. Ретиналь имеет энергию колебаний 1,5 · 10⁻²¹ Дж, что соответствует энергии колебаний родопсина.

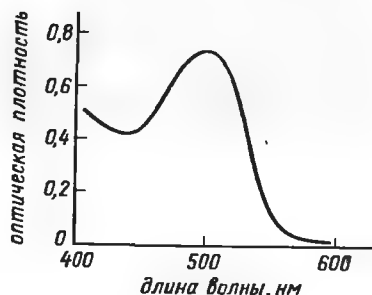
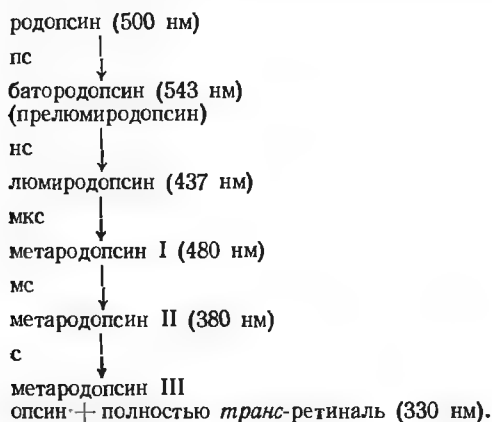


Рис. 55. Спектр поглощения зрительного родопсина

ближе к С-концу белка. Пигменты из колбочек сетчатки глаза человека, условно названные по области поглощаемого ими света «красный», «голубой» и «зеленый», имеют в своей структуре чередование гидрофобных и гидрофильных участков, при этом «красный» и «зеленый» пигменты обладают высокой степенью гомологии с родопсином из палочек, а «голубой» значительно отличается от него.

Бактериородопсин и родопсин из палочек сетчатки практически не имеют гомологичных участков, однако они формируют очень похожие структуры в мембране, состоящие в каждом случае из 7 гидрофобных столбов. Вряд ли эти два пигмента имеют какую-либо прямую эволюционную связь. По-видимому, упаковка в 7 α -спиральных столбов молекулы ретиналя является оптимальным способом обеспечения его функционирования в мембране в качестве первичного «приемника» кванта света.

Родопсин обладает характерным спектром поглощения в областях 280 и 500 нм (рис. 55). Поглощение при 500 нм обуславливается специфическим воздействием хромофора с белковым окружением. В основе функционирования родопсина, так же как и бактериородопсина, лежит изомеризация ретиналя под действием света. При поглощении кванта света 11-*цис*-ретиналь родопсина переходит полностью в *транс-форму*. Эта изомеризация запускает каскад реакций, сопровождающихся изменением спектра поглощения молекулы родопсина:



Таким образом, результат поглощения фотона родопсином — образование опсина и свободного ретиналя. Другой результат этого процесса — гиперполяризация мембраны палочек. В норме в мембране существует «темновой ток», обеспечивающийся входом в клетку натрия и выходом калия за счет работы N, K-АТФазы (см. гл. III.2.1). Трансмембранный потенциал при этом составляет 20 мВ. Вспышка света вызывает гиперполяризацию мембраны до 70 мВ. При этом чем интенсивней свет, тем сильнее выражена гиперполяризация мембраны (рис. 56).

Гиперполяризация мембран измеряется с помощью микроэлектродной техники и может быть имитирована приложением напряжения к мембране. С помощью этого метода было доказано, что гиперполяризация мембраны палочки является необходимым и достаточным условием передачи светового сигнала через синапсы к зрительным нейронам.

Таким образом, поглощение кванта света ретиналем родопсина, локализованным в диске, должно привести к гиперполяризации плазматической мембраны палочек, непосредственно не связанной с мембраной фоторецепторного диска (см. рис. 54). Оказалось, что вторичным мессенджером в этом процессе выступает цГМФ. Наиболее убедительные электрофизиологические доказательства того, что именно цГМФ выполняет роль вторичного мессенджера, открывая натриевые каналы в плазматической мембране, были получены в Институте биофизики АН СССР в Пу-

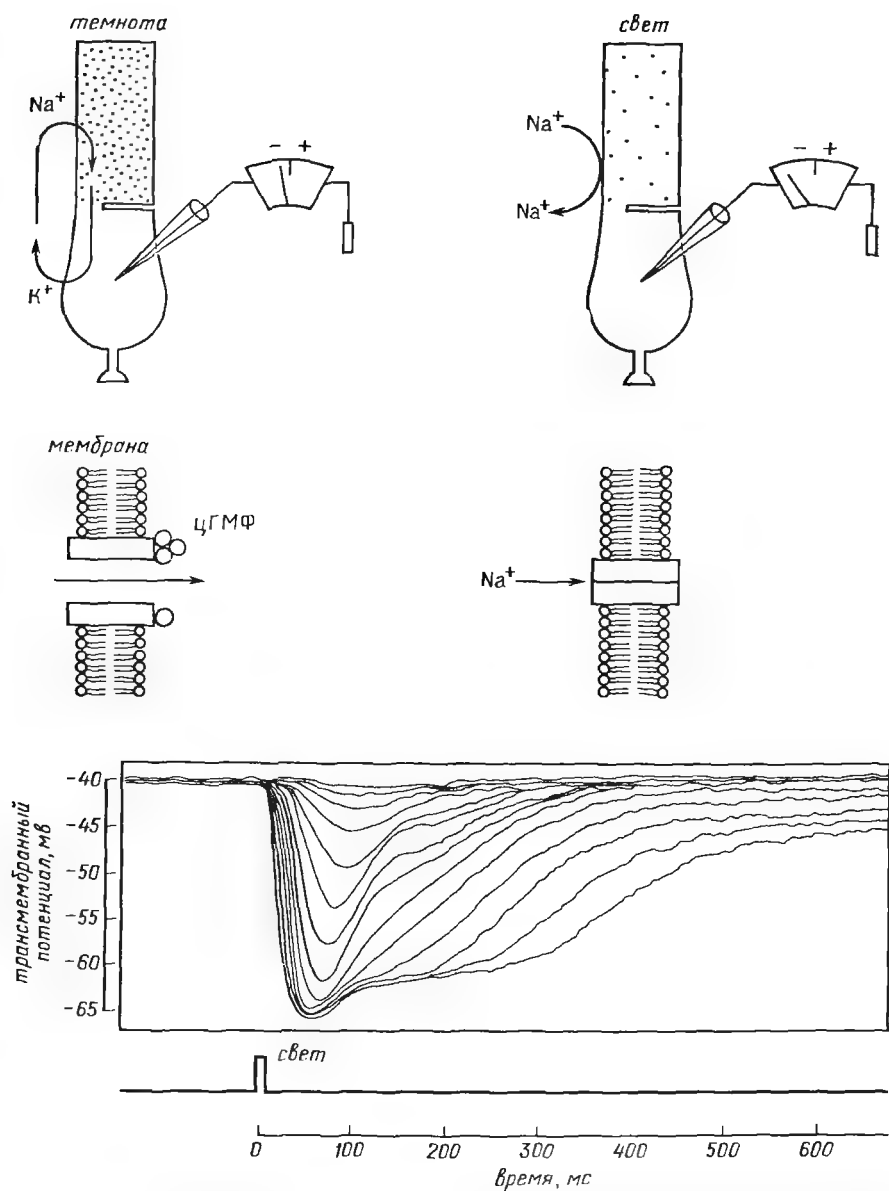


Рис. 56. Схема регистрации и запись гиперполяризационных фотопотенциалов «красной» колбочки сетчатки черепахи. Величина трансмембранного потенциала зависит от интенсивности вспышки света (Шнапф, Бэйлор, 1987)

щино-на-Оке в лаборатории Е. Фесенко. Методом пэтч-клямпа¹ было показано, что фрагмент мембраны наружного сегмента палочки сетчатки лягушки в ответ на цГМФ увеличивает свою проницаемость для ионов натрия. Кинетический анализ скорости прохождения натрия через мембрану показал наличие специального натриевого канала, открываемого цГМФ.

Наличие вторичного мессенджера в виде цГМФ вызвало необходимость предположить существование белка-посредника между родопсином и ГТФ, регулирующего процесс образования цГМФ. Этот белок был обнаружен в лаборатории Л. Страйера и назван *трансдуцином*, так как он участвует в трансдукции (преобразовании) светового сигнала в электрический. Оказалось, что трансдуцин состоит из трех субъединиц — α , β и γ , способных к диссоциации.

Активированная светом молекула родопсина — метародопсин-II — образует специфический комплекс с трансдуцином, находящимся в ГДФ-связанной форме — ГДФ связывается с α -единицей трансдуцина (рис. 57). Взаимодействие родопсина с трансдуцином катализирует обмен на α -субъединице ГДФ на ГТФ. После этого комплекс трансдуцина с родопсином диссоциирует, и практически одновременно происходит диссоциация трансдуцина на α -субъединицу, связанную с ГТФ, и на комплекс, состоящий из β - и γ -субъединиц. α -Субъединица трансдуцина в ГТФ-связанной форме активирует цГМФ-зависимую фосфодиэстеразу. Этот фермент также состоит из трех субъединиц (α , β и γ). Ингибирование осуществляется за счет связывания ГТФ формы α -субъединицы с γ -субъединицей фосфодиэстеразы. При этом γ -субъединица отделяется, а свободные α - и β -субъединицы осуществляют гидролиз ГТФ, причем с очень большой скоростью (4200 молекул в секунду). Активирующее влияние трансдуцина на фосфодиэстеразу прекращается после гидролиза ГТФ. В дальнейшем комплекс β - и γ -субъединиц трансдуцина ассоциирует с ГДФ-связанной формой α -субъединицы, и молекула трансдуцина снова приобретает способность взаимодействовать с фотоактивированным родопсином. Отдельная α -субъединица не может взаимодействовать с молекулой родопсина. Далее весь цикл повторяется. Продолжительность цикла — несколько миллисекунд.

Еще в начале 1940-х годов С. Хохтом, С. Шлаером и М. Пиренном (США) было показано, что человеческий глаз воспринимает вспышку при поглощении всего лишь в 7 фотонов. Поскольку фотоны распределяются между большим количеством палочек, естественно предположить, что палочке достаточно одного фотона, чтобы сформировать ответ на сигнал. Таким образом, глаз работает как мощный фотоумножитель. Описанная выше схема позво-

¹ Метод основан на том, что фрагмент мембраны «вытягивается» специальным микроэлектродом из мембранной структуры (в данном случае палочки сетчатки), фиксируется в нем, что позволяет исследовать электрические и проводящие свойства этого фрагмента.

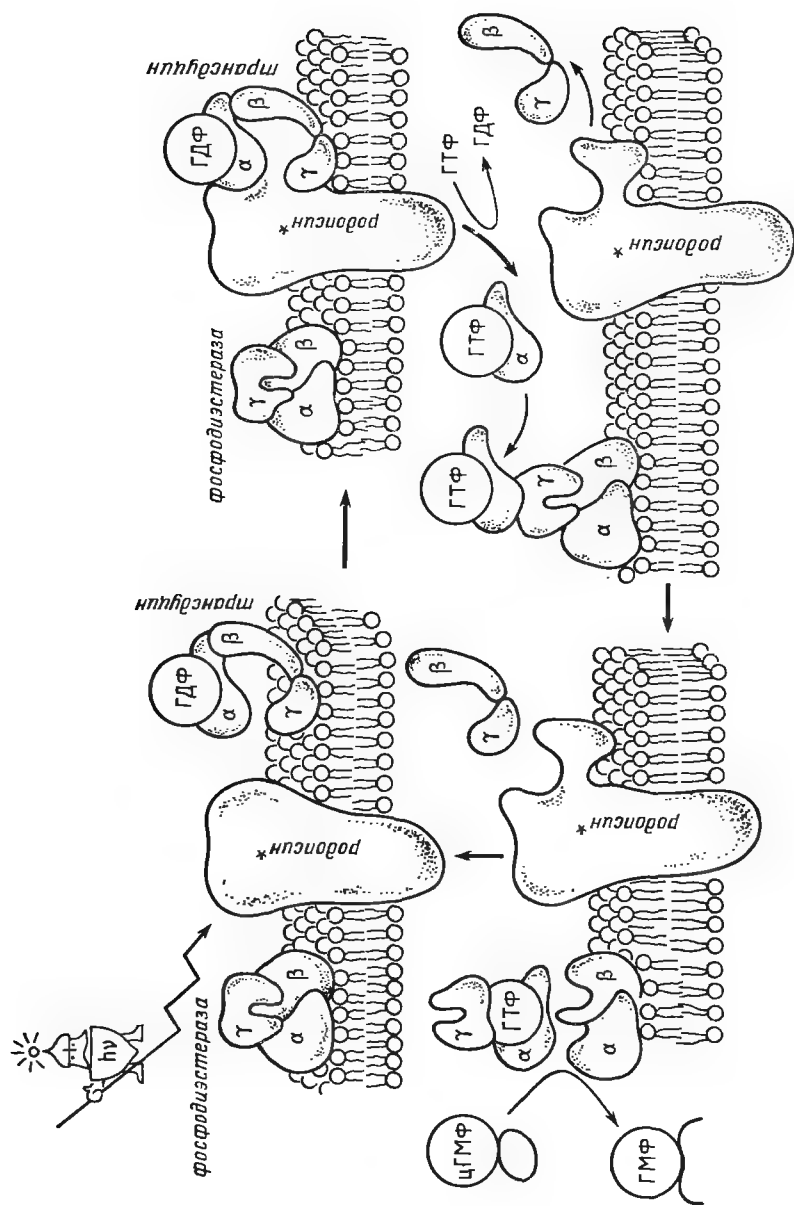


Рис. 57. Механизм функционирования зрительного родопсина

ляет полностью представить молекулярный механизм усиления сигнала при рецепции.

В результате активации одной молекулы родопсина образуется несколько сотен активных комплексов α -субъединицы трансдуцина с ГТФ. Это первая ступень усиления. Затем α -субъединица активирует фосфодиэстеразу. На этой стадии нет усиления, так как каждой субъединицей активируется только одна молекула фосфодиэстеразы. Затем комплекс α -субъединицы с фосфодиэстеразой (который не диссоциирует, пока не пройдет гидролиз ГТФ) осуществляет превращение нескольких тысяч молекул цГМФ. При этом происходит вторичное, более чем тысячекратное усиление. Далее механизм усиления работает на мембранном уровне, регулируя натриевые каналы, и молекулярное усиление сигнала превращается в электрическое.

Трансдуцин играет ключевую роль не только в активации, но и в инаktivации сигнала. Включение и выключение сигнала осуществляются через α -субъединицу. При этом ключевой стадией деактивации является гидролиз ГТФ до ГДФ. Реакции, ведущие к активации, энергетически выгодны. Некоторые же реакции деактивации требуют дополнительной энергии.

Родопсин инаktivируется с помощью специальной киназы. Этот фермент присоединяет фосфатные группы к нескольким аминокислотам на одном конце полипептидной цепи опсина. Затем родопсин образует комплекс с белком, называемым *арестином*, который блокирует связывание трансдуцина и возвращает систему в исходное «темновое» состояние (см. рис. 57).

Несмотря на то, что механизм передачи сигнала от фоторецепторного диска к плазматической мембране изучен достаточно подробно, ряд вопросов остается не выясненным. Во-первых, не понятна роль другого вторичного мессенджера — ионов кальция. В описанных выше экспериментах по пэтч-клямпу Ca^{2+} , в отличие от цГМФ, не влиял на работу натриевых каналов. Однако в некоторых работах было показано, что светозависимое увеличение концентрации внутриклеточного кальция приводит к гиперполяризации мембраны, которая исчезает после удаления ионов Ca^{2+} . При этом введение в палочку хелатирующих Ca^{2+} агентов снижает чувствительность фоторецепторной клетки к свету.

В последнее время активно обсуждается роль второго фосфоинозитидного пути в передаче сигнала в фоторецепторной клетке. Показано, что однократное освещение приводит к активации фосфоинозитидного цикла. Возникло предположение, что фосфоинозитидный цикл может активироваться трансдуцином по аналогии с работой G-белка (см. рис. 52). Однако связывание трансдуцина коклюшным токсином не влияло на светозависимую активацию фосфоинозитидного цикла, что позволило исключить роль трансдуцина в механизме передачи сигнала в палочке по второму пути.

В 1987 г. было показано, что освещение палочек активирует фосфолипазу A_2 , и этот процесс зависит от трансдуцина, так как

ингибируется коклюшным токсином. По-видимому, фосфоинозитидный цикл может играть физиологическую роль в регуляции передачи сигнала в фоторецепторной клетке, однако эти механизмы еще предстоит исследовать.

Функционирование родопсина в фоторецепторных дисках существенно зависит от липидного окружения. В фоторецепторной мембране очень низкое содержание холестерина, а основные фосфолипиды, входящие в ее состав (фосфатидилхолин — 40%, фосфатидилэтаноламин — 38%, фосфатидилсерин — 13%), содержат громадное количество полиненасыщенных жирных кислот (до 90%). Такой состав мембраны, по-видимому, обусловлен тем, что для функционирования родопсина необходима максимально «жидкая» мембрана. Однако большое количество полиненасыщенных жирных кислот делает фосфолипиды сетчатки уязвимыми для развития перекисного окисления липидов. Процессы перекисного окисления липидов и их роль в патологии мембран будут разобраны в гл. VIII.

VI.2.1. Трансдуцин и G-белки — родственные ферменты

Механизмы работы фоторецепторов и рецепторов гормонов во многом подобны (см. рис. 49). Связывание гормона с рецептором приводит к активации G-белка, а возбуждение родопсина квантом света — к активации трансдуцина (рис. 58). Как активация G-белка, так и активация трансдуцина включают связывание ГТФ α -субъединицей. G-белок активирует аденилатциклазу (АЦ), а трансдуцин — фосфодиэстеразу (ФДЭ). Оба этих фермента осуществляют свои функции через циклические нуклеотиды. цАМФ участвует в регуляции ферментов — эффекторов гормонов, а цГМФ, расщепляясь, открывает натриевый канал в плазматической мембране фоторецепторной клетки. Аналогия в передаче сигнала в фоторецепторной клетке с передачей гормонального сигнала усиливается тем, что трансдуцин и G-белок имеют не только общие функции, но и общую структуру. Все исследованные к настоящему времени белки этой группы имеют идентичные β -субъединицы, а α -субъединица выполняет везде сходные функции. Исследование первичной структуры трансдуцина и трех G-белков из различных клеток выявило, что более 50% полипептидных цепей практически полностью гомологичны. При этом в составе α -субъединиц как трансдуцина, так и G-белков имеются как константные участки, так и участки, модифицирующиеся в ходе эволюции. Все G-белки и трансдуцин имеют три центра связывания: для рецептора, для ГТФ и ГДФ и для белка-эффектора (аденилатциклазы для комплекса рецептор — гормон и фосфодиэстеразы — в случае трансдуцина). Наиболее консервативными последовательностями аминокислот обладают места связывания ГТФ и ГДФ.

Интересно, что участки связывания ГТФ и ГДФ в G-белках и трансдуцине оказались гомологичными областями связывания ГТФ в белке совершенно другого класса, так называемом факторе элонгации T_u . Этот фактор участвует в синтезе белка, образует комплекс с ГТФ с молекулами аминоацил-тРНК, обеспечивая доставку аминокислот к месту удлинения полипептидной цепи. Цикл

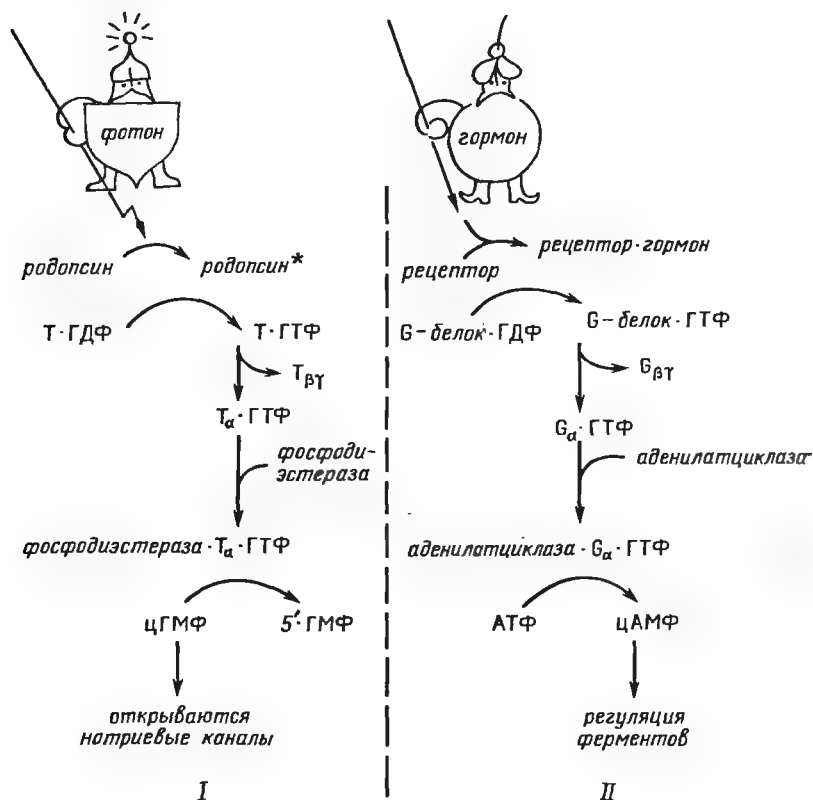


Рис. 58. Сравнение путей передачи сигнала при возбуждении зрительного родопсина (I) и при действии гормона (II)

функционирования этого белка похож на цикл функционирования G-белков и трансдуцина — в основе его лежит механизм расщепления, связанного в активном центре цГМФ. Высказывается предположение, что T_u -фактор был эволюционным предком трансдуцина и G-белков. Если это так, то мы имеем еще одно подтверждение единства биохимической эволюции. Один раз найденный природой механизм становится универсальным и используется для решения различных задач, возможно, потому, что другими способами (которых может быть бесконечно много) решать эту задачу нерационально.

1. Как устроены палочки и колбочки сетчатки?
2. Как функционирует зрительный родопсин?
3. Сравните зрительный родопсин и бактериородопсин.
4. Что общего в функционировании G-белков и трансдуцина? Чем отличаются эти белки?
5. Опишите эксперименты, доказывающие, что цГМФ является вторичным мессенджером при передаче сигнала от возбужденной светом молекулы родопсина.

VI.3. РЕЦЕПТОРЫ ВОЗБУДИМЫХ ТКАНЕЙ

Передача сигнала через мембрану не всегда сопряжена с включением G-белка фосфоинозитидного цикла. Большая часть рецепторов работает по принципу самостоятельного канала. Эти рецепторы объединяются в класс рецепторов быстрого ответа (fast responding) и осуществляют ответ на сигнал в течение нескольких миллисекунд. На возбудимые ткани, к которым относятся нервные, мышечные и секреторные клетки, информация передается через специальное образование — синапс (рис. 59). Из окончания нервной клетки выделяется нейромедиатор, взаимодействующий с рецепторами постсинаптической мембраны другой клетки. Наиболее типичным примером подобных рецепторов является ацетилхолиновый рецептор (холинорецептор). То, что этот белок является ионным каналом, было постулировано еще в 1953 г. Д. Нахмазоном. Холинорецепторы подразделяются на два типа: *никотиновые* и *мускариновые*. Как для первых, так и для вторых агонистом является ацетилхолин, однако первый тип рецепторов активируется никотином, а второй — мускарином, веществом, содержащимся в мухоморе (*Amanita muscaria*) (рис. 60).

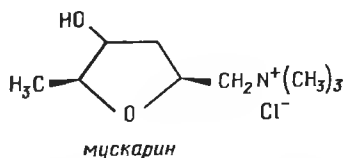


Рис. 60. Мускарин

Никотиновые рецепторы расположены в месте контакта аксонов со скелетными мышцами, а мускариновые сосредоточены в мозге, секреторных клетках, гладкой и сердечной мышцах. Успех в исследовании рецепторов во многом обязан применению для изучения их структуры природных токсинов, ядов, в первую очередь ядов змей, некоторых земноводных. В предыдущем разделе упоминалось, что некоторые токсины действуют на передачу сигнала, связываясь с аденилатциклазой, G-белками. Яды пчел и змей содержат фосфолипазы, разрушающие фосфолипиды мембран, что также приводит к разрушению передачи сигнала в клет-

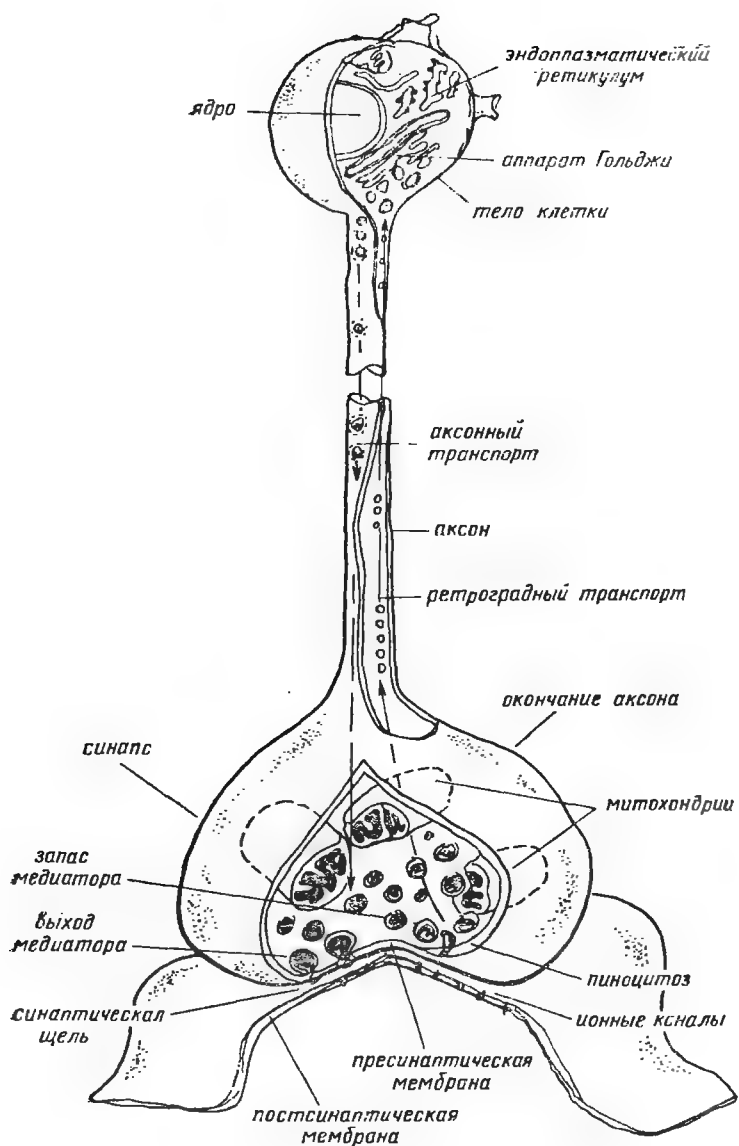


Рис. 59. Синапс

ке, но наиболее прямой путь парализовать жертву — ингибировать ее быстрые рецепторы. Этим путем и пошла эволюция, в результате которой у некоторых животных из различных классов (рыбы, земноводные, змеи, насекомые) появились яды — блокаторы быстрых рецепторов. Эти блокаторы оказались прекрасным инструментом в руках ученых, исследующих рецепторы.

α -Бунгаротоксин из яда крайта (*Bungarus multicircetus*) — змеи семейства эланидов: кобры, мамбы, крайта — способен селективно и необратимо связываться с холинорецептором. Это позво-

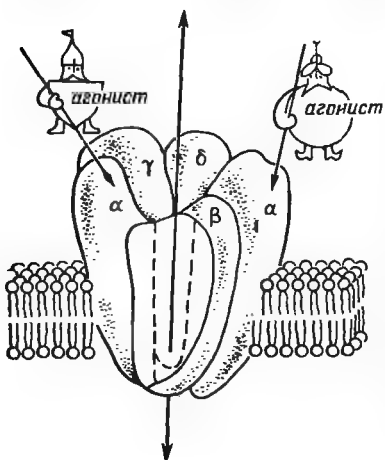


Рис. 61. Структура холинорецептора

волило идентифицировать рецептор и приготовить аффинные сорбенты для его выделения. Первичная структура холинорецептора сначала была установлена для белка электрического органа ската (в этой ткани концентрация рецептора более чем на два порядка превышает его концентрацию в других тканях, что существенно облегчает процедуру его выделения). Позднее на основе исследования соответствующих генов первичная последовательность холинорецептора была определена для человека, теленка, цыпленка и некоторых других животных.

Холинорецептор состоит из четырех субъединиц — α , β , γ и δ ; их молярное соотношение в белке 2:1:1:1, а молекулярные мас-

сы — 40, 50, 60 и 65 кДа соответственно. Все субъединицы рецептора гликозилированы, и на долю углеводного компонента приходится около 20 кДа. Первичная последовательность всех субъединиц холинорецептора у различных классов животных весьма консервативна: гомология превышает 50, а для некоторых субъединиц (например, α -субъединица электрического ската и человека) — 80%. Удалось реконструировать холинорецептор, обладающий функциональной активностью, из α -, β -, δ -субъединиц ткани электрического ската и γ -субъединицы теленка.

Как же работает холинорецептор? Пять его субъединиц, вероятно, в последовательности α — β — α — γ — δ образуют канал, проницаемый для ионов натрия, калия, кальция и даже некоторых органических катионов (рис. 61). Рецептор может находиться в трех состояниях: покоя, открытом (активированном) и десенситизированном. Активация канала осуществляется связыванием рецептора с ацетилхолином, в десенситизированном состоянии агонист еще связан с рецептором, но канал уже закрыт. Переход из одного состояния в другое сопровождается конформационной перестройкой субъединиц. Детальный механизм «открыва-

ния» и «закрывания» ворот канала в настоящее время еще неясен.

По «канальному» механизму работают и некоторые другие рецепторы, данные о которых суммированы в табл. 21. Все эти рецепторы имеют близкую молекулярную массу и, как правило,

Т а б л и ц а 21

Рецепторы-каналы (Fast responding)

Тип рецептора	Функция	Молекулярная масса (кДа)	Субъединичный состав
Холинэргический (никотиновый)	деполяризация Na^+/K^+	250	α (40), β (50)
Рецептор γ -аминомасляной кислоты (GABA _A)	гиперполяризация Cl^-	230	γ (60), δ (65) α (53), β (57)
Рецептор глутамата	деполяризация Na^+/K^+	263	—
Рецептор глицина	гиперполяризация	446	48, 58

состоят из нескольких субъединиц. В зависимости от селективности ионов, пропускаемых каналом, эти рецепторы генерируют деполяризацию или гиперполяризацию мембраны, которая лежит в основе их физиологической функции (см. табл. 21). Вполне вероятно, что «ворота» каналов всех этих рецепторов открываются по единому механизму, так как у некоторых субъединиц различных рецепторов найдены гомологичные участки.

Второй класс рецепторов осуществляет свои функции через G-белки и фосфоинозитидный цикл (см. VI.1). Ответ этих рецеп-

Т а б л и ц а 22

Рецепторы, осуществляющие свои функции через G-белки и фосфоинозитидный цикл

Показатель	Тип	Механизм* действия	Размер субъединиц (кДа)
Холинэргический (мускариновый) рецептор	M_1/M_2	P_iP_2 — PLC AC↓ K^+ -канал	70—80 ($5 + M_1, M_2$)
Адренэргический рецептор	α_1 α_2 β_1 β_2	P_iP_2 — PLC↑ AC↓ AC↑ AC↑	59, 80 64 40—45 (54) (эритроциты) 58—60 (эритроциты) 65—67 (в других клетках)
Рецепторы дофамина	D D_2	AC↑ AC↓; P_iP_2 — PLC	72 83—94
Опиатные рецепторы	σ μ	AC↓ AC↓	53—58 58—65
Рецепторы серотонина	5HT ₂	P_iP_2 — PLC↓	67

* AC↑ — активация, AC↓ — ингибирование аденилатциклазы, P_iP_2 — PLC↑ — активация, P_iP_2 — PLC↓ — ингибирование фосфолипазы в фосфоинозитидном цикле.

торов более длителен (секунды), тем не менее по этому механизму работают не только гормональные рецепторы, но и наиболее широкий класс рецепторов возбудимых тканей. В нервной ткани через этот тип рецепторов действует большая группа моноаминовых нейротрансмиттеров и нейромодуляторов (нейропептиды). В отличие от первой группы эти рецепторы имеют более простую структуру, что естественно, так как они являются только частью мембранной системы, осуществляющей трансмембранную передачу сигнала.

К этому классу относятся мускариновый холинэргический рецептор, адренергические рецепторы, опиатные рецепторы коры полусферий мозга и некоторые другие (см. рис. 61). Основные характеристики этих рецепторов приведены в табл. 22.

VI.4. РЕЦЕПТОРЫ, ОТВЕЧАЮЩИЕ ЗА ПЕРЕНОС МАКРОМОЛЕКУЛ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ В КЛЕТКУ

Информация может передаваться в клетку не только с помощью ионного канала или цепи реакций, осуществляемых G-белками. На поверхности некоторых клеток имеются рецепторы, способные распознавать макромолекулы и «организовывать» их перенос через мембрану внутрь клетки. К таким клеткам относятся макрофаги, осуществляющие один из первых актов включения иммунной системы. В этом случае участок плазматической мембраны обволакивает захватываемый материал, который в результате попадает внутрь клетки. При этом он заключен в мембранный пузырек-везикулу, стенки которой образуются из участка плазматической мембраны.

Существуют три вида эндоцитоза: 1) фагоцитоз — захват клеткой больших комплексов, вплоть до целых клеток, например клеток бактерий одноклеточными организмами и макрофагами; 2) пиноцитоз — неспецифический захват клетками внеклеточной жидкости; 3) эндоцитоз — специфический захват, опосредованный специальными рецепторами (рис. 62).

В этом разделе мы рассмотрим только специфический эндоцитоз. Впервые эндоцитоз, обусловленный специфическими рецепторами, был обнаружен К. Портером и Г. Ротом в 1964 г. при изучении захвата яйцеклетками белков, которые используются клеткой для питания зародыша. Позднее было выяснено, что некоторые белки синтезируются в печени, оттуда переносятся руслом крови к яичникам, там связываются со специфическими рецепторами плазматической мембраны ооцита, а затем происходит «впячивание» плазматической мембраны, после чего рецептор с белком попадает внутрь клетки.

У млекопитающих по механизму опосредованного специфическими рецепторами эндоцитоза передается иммунитет от материнского организма к плоду. Антитела из кровотока материнского организма связываются с клетками плода, окружающими желточ-

ный мешок. На поверхности этих клеток имеются рецепторы, специфически связывающиеся с иммуноглобулинами и переносящие их в кровоток плода. С помощью эндоцитоза функционируют клетки иммунной системы.

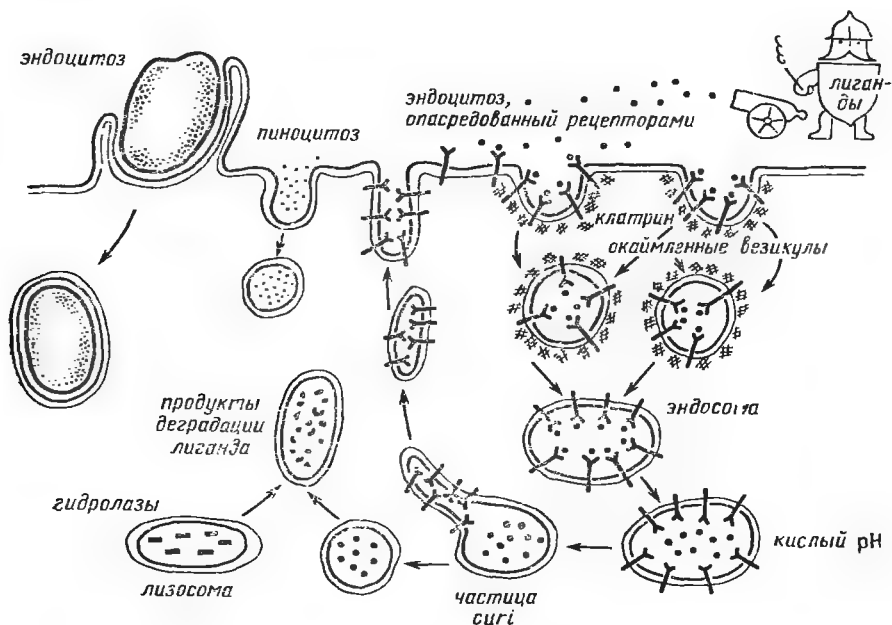


Рис. 62. Типы эндоцитоза

Макрофаги захватывают антиген, внутри клетки он претерпевает процессинг — расщепление гидролитическими ферментами с вычленением сравнительно небольших фрагментов, несущих отдельные антигенные детерминанты. Заключительный этап этого процесса — экспрессия (обратный транспорт) фрагментов антигена на поверхность макрофага, где они оказываются в комплексе с собственными антигенами гистосовместимости II класса (которые тоже можно рассматривать как своего рода рецепторы). После этого запускается дальнейшая цепь иммунологических реакций, в которой участвуют лимфоциты различных типов.

VI.4.1. Рецепторы липопротеинов низкой плотности

С помощью опосредованного рецепторами эндоцитоза происходит захват клетками из кровяного русла липопротеинов низкой плотности (ЛНП). Это — основное средство «доставки» к клеткам холестерина. Липопротеины низкой плотности —

это циркулирующие в кровяном русле частицы диаметром около 22 нм и массой 30000 кДа.

Ядро такой частицы состоит из полутора тысяч молекул холестерина, каждая из которых образует эфирную связь с молекулой жирной кислоты. Ядро окружено оболочкой из фосфолипидов и холестерина, в которую погружена молекула белка — апопротеин В-100.

В 1973 г. М. С. Брауном и Д. Л. Голдстейном в лаборатории Научно-исследовательского медицинского центра Техасского университета в Далласе были открыты рецепторы ЛНП на мембранах фибробластов. Им удалось показать, что рецепторы фибробластов специфически связывают ЛНП за счет «узнавания» апопротеина В-100 или апопротеина Е. При этом специфичность так велика, что связывание происходит даже при концентрации ЛНП 10^{-9} М. Механизм проникновения рецепторов, связавшихся с ЛНП в клетку, точно соответствует описанному выше (движение рецепторов к окаймленным порам, образование везикул и т. п., см. рис. 62).

Свободный холестерин, покидая лизосомы, участвует в формировании мембран, а в специализированных клетках надпочечников и яичников включается в синтез стероидных гормонов — кортизола и эстрадиола. Рецепторы ЛНП присутствуют практически во всех тканях, но наибольшая их плотность наблюдается в клетках печени, надпочечников и яичников — органах, испытывающих наибольшую потребность в холестерине.

Транспорт холестерина в кровяном русле в виде ЛНП — одна из стадий сложного метаболизма липидов, который изучен еще недостаточно. ЛНП образуются из липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП), которые секретируются клетками печени. Ядро этих частиц состоит из синтезирующихся в печени триглицеридов и в меньшем количестве — из их эфиров. На поверхности ЛОНП экспонированы две мишени для рецепторов, осуществляющих эндоцитоз, — апоферменты В-100 и Е.

Когда частицы ЛОНП достигают капилляров жировой или мышечной ткани, происходит видоизменение частиц за счет экстракции из них в клетки триглицеридов. Оставшиеся частицы меньше по размеру и менее плотные. Они получили название липопротеины промежуточной плотности (ЛПП). На поверхности этих частиц по-прежнему экспонированы апопротеины В-100 и Е. ЛПП циркулируют в крови, как правило, непродолжительное время (у человека 2—6 ч). Они быстро связываются клетками печени, которые извлекают из них холестерин, идущий на образование новых частиц ЛОНП, синтез желчных кислот, возобновление собственных мембран. Быстрый захват клетками печени ЛПП обусловлен высоким сродством специфических рецепторов их плазматических мембран к апоферменту Е. Частицы ЛНП образуются из незахваченных клетками печени ЛПП после того, как они утратят апофермент Е. Детальный механизм образования ЛНП из ЛПП окончательно неясен. По-видимому, именно отсутствие у час-

тиц ЛНП апофермента *E* позволяет им значительно дольше циркулировать в кровяном русле (у человека 2,5 сут). Нарушение взаимодействия ЛНП с рецепторами плазматических клеток лежит в основе развития атеросклероза.

ВОПРОСЫ

1. *Какие рецепторы называют «быстрыми», а какие «медленными»?*
2. *Как устроен холинорецептор?*
3. *Опишите основные экспериментальные подходы, использующиеся в исследовании рецепторов, роль в этих исследованиях токсинов, специфически связывающихся с рецепторами.*
4. *Что такое фагоцитоз, пиноцитоз и эндоцитоз? Какова роль мембранных рецепторов в этом процессе?*
5. *Как липопротеины проникают в клетки?*

Глава VII. БИОГЕНЕЗ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

В клетке происходит непрерывный синтез компонентов мембран, сборка элементов мембран и целых мембранных структур. В клетках печени теплокровных животных полупериод жизни плазматической мембраны составляет 2—3 дня, внешней мембраны митохондрий — 5—6 дней, внутренней — 8—10 дней. Наиболее быстро обновляются мембраны эндоплазматического ретикулума печени — полупериод их жизни составляет всего 1—2 дня. Биогенез биологических мембран является наиболее существенным моментом развития, и дифференциация клеток в первую очередь связана с изменением их мембранных структур.

VII.1. БИОГЕНЕЗ МЕМБРАН И МЕТАБОЛИЗМ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ

Фосфолипиды — основные компоненты биомембран. Они непрерывно синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи. Холестерин синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме, а также доставляется в клетки с помощью опосредованного рецепторами эндоцитоза (см. гл. VI).

Синтез фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина, осуществляющийся с помощью этаноламин- и холинфосфодиэстеразы, протекает как в эндоплазматическом ретикулуме, так и в аппарате Гольджи. Однако около 90% активности этих ферментов в клетках печени локализовано в эндоплазматическом ретикулуме и только 1% — в аппарате Гольджи. В очищенной плазматической мембране клеток печени активность этого фермента не обнаружена. Синтез фосфатидилинозитола идет в микросомной фракции печени и мозга, тогда как синтез фосфатидилглицерина и кардиолипина происходит в митохондриях, где эти липиды преимущественно и локализуются (см. I.1.1).

В процессе превращения фосфатидилсерина в фосфатидилэтаноламин в митохондриях, а также при синтезе сфингомиелина с помощью переноса фосфохолиновой группы от фосфатидилхолина к керамиду в плазматической мембране в качестве субстратов используются фосфолипиды, синтезированные ранее в эндоплазматическом ретикулуме. Таким образом, внутриклеточный транспорт липидов — важнейший процесс биогенеза клеточных мембран.

Липиды доставляются не только к определенным органеллам, но и встраиваются в соответствующий монослой мембраны, обуславливая ее асимметричность. Асимметричность мембран определяется не только различием фосфолипидного состава внешнего и внутреннего слоев, но и различной насыщенностью жирнокислотных остатков, входящих в состав этих фосфолипидов.

Эндоплазматический ретикулум составляет липиды всем органеллам клетки и плазматической мембране. Ферменты, включающиеся в финальную стадию биосинтеза фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, локализованы на цитоплазматической поверхности микросомных везикул, выделяемых из клеток печени крыс. Последующие исследования показали, что синтез фосфатидилсерина и фосфатидилинозита также локализован на этой поверхности. Поскольку липиды эндоплазматического ретикулума организованы в бислои, то, естественно, возникает вопрос, как синтезированные на внешней поверхности бислоя липиды транспортируются на внутреннюю сторону мембраны?

Изучение трансмембранного перемещения липидов шло в трех направлениях.

1. Изучение липидных везикул. Было показано, что время полуобмена липидов между паружным и внутренним слоями очень велико и не может иметь физиологического значения.

2. Исследование мембран эритроцитов и микросомных везикул показало, что обмен липидов в нативных мембранах между внутренним и внешним слоями происходит достаточно медленно (в течение нескольких часов). Позднее было продемонстрировано, что в быстро растущих клетках (микросомальная фракция бактерии *Bacillus megaterium*) полуобмен липидами между различными сторонами мембраны происходит в течение нескольких минут. Отсутствие сколь-либо значительного трансмембранного переноса липидов в везикулах, полученных из мембранных фосфолипидов, позволило предположить необходимость специального фермента «флиппазы». Существование такого фермента было постулировано Бретчером в 1978 г.

3. Исследования, направленные на поиск этого гипотетического фермента — переносчика липидов, способов регистрации его активности. Сравнение скорости трансмембранного переноса диглицерида (очень быстрая) со скоростью обмена соответствующего фосфатидилдиглицерина (очень медленная) позволило предположить, что в движении через мембрану основным препятствием служат гидрофильные полярные группы фосфолипидов. Было выдвинуто предположение, что «флиппаза» облегчает транспорт полярных группировок через мембрану.

В. Р. Бишоп и Р. М. Бели в 1984 г. нашли в микросомных мембранах печени крыс переносчик для водорастворимых короткоцепочечных фосфолипидов. Транспорт этих липидов не регистрировался в клетках крови и липидных везикулах, а в микросомах был весьма чувствителен к действию протеолитических ферментов и

обработке N-этилмалеимидом. Интересно, что этот транспортный белок различал изомеры sn-1,2-фосфатидилхолин; sn-2,3-фосфатидилхолин, перенося их через микросомальную мембрану с различной скоростью.

В настоящее время «флиппаза» не выделена в чистом виде и, несмотря на ряд экспериментов, подтверждающих существование этого переносчика, остается гипотетическим ферментом. Недавно было показано, что транспорт аминокислотсодержащих фосфолипидов через эритроцитарную мембрану требует энергии АТФ. Возможно, что «флиппазы» представляют новый вид АТФаз.

VII.2. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ ЛИПИДОВ

При исследовании внутриклеточного транспорта липидов, так же как и при изучении трансмембранного переноса, используются фосфолипиды, несущие радиоактивную или флуоресцентную метку. Внутри клетки липиды транспортируются двумя независимыми способами: в виде везикул или отдельных молекул в комплексе с белками-переносчиками. Как уже отмечалось, биогенез мембран требует переноса липидов от мембран эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи к митохондриям, лизосомам, другим мембранным структурам и цитоплазматической мембране. По-видимому, возможен и обратный перенос липидов от органелл к микросомам.

В транспорте липидов с помощью везикул участвует цитоскелет клетки, поэтому для исследования такого рода переноса липидов используют агенты, которые модифицируют элементы цитоскелета — винбластин (антимикротубулин), цитохалазин В, а также некоторые другие агенты.

При исследовании транспорта липидов с помощью белковых переносчиков используют различные белки, получаемые из супернатанта после осаждения мембранных структур при 100 000 g.

VII.2.1 Внутриклеточный транспорт холестерина

Обмен холестерина между органеллами в клетке идет с достаточно большой скоростью (период полуобмена зависит от типа мембран и составляет 1—2 ч). В супернатанте печеночных клеток были найдены белки, способные эффективно связывать холестерин и, по-видимому, участвовать в его транспорте. Это так называемые холестерин-транспортные факторы, холестеринсвязывающие белки, стеринпереносящие белки. Несмотря на то что эти белки обнаружены довольно давно, механизмы, с помощью которых они осуществляют внутриклеточный транспорт холестерина *in vivo* и поддерживают неравномерное содержание этого липида

в различных мембранах, неясны. Транспорт холестерина в митохондриях в ходе стероидогенеза ингибируется цитохалазином В и винбластином, что позволяет предположить участие в этом процессе цитоскелета.

Транспорт холестерина от эндоплазматического ретикулума к плазматической мембране был детально исследован с помощью меченого холестерина методом быстрого выделения мембранных структур. Объектом в этих работах служили яйцеклетки китайского хомячка. Было показано, что при 37° С вновь синтезированный меченый холестерин появляется в плазматической мембране уже через 10 мин после обнаружения меченого стерина в интактной клетке. Транспорт холестерина блокировался довольно большими концентрациями энергетических ядов KCN и KF. При этом цитохалазин В, колхицин, лонексин и циклогексимид не влияли на перенос холестерина, что позволило авторам исключить из этого транспортного процесса аппарат Гольджи и цитоскелет. Тем не менее в транспортных цистернах аппарата Гольджи (на роли аппарата Гольджи во внутриклеточном транспорте мы подробно остановимся ниже) обнаружено высокое содержание холестерина, что ставит под сомнение исключение этих структур из транспортных систем холестерина внутри клетки.

VII.2.2. Внутриклеточный транспорт фосфолипидов

Спонтанный транспорт фосфолипидов между различными органеллами — очень медленный процесс с полупериодом около 12 ч. Возможно, он имеет физиологическое значение при биогенезе биомембран. В то же время транспорт вновь синтезированных фосфолипидов в митохондрии из эндоплазматического ретикулума в клетках печени крыс осуществляется в течение нескольких минут. Из цитозоля клеток печени были получены белки, способные осуществлять перенос фосфолипидов между органеллами в опытах *in vitro*, но неизвестно, как эти процессы протекают в клетке *in vivo*.

Везикулярный механизм транспорта фосфолипидов между органеллами и цитоплазматической мембраной был доказан для одноклеточных (*Acanthamoeba palestinensis* и *Dictyostelium discoideum*). В клетках высших животных он, по-видимому, тоже может иметь место. Однако транспорт вновь синтезированного фосфатидилэтаноламина в клетках фибробластов китайских хомячков не блокировался энергетическими ядами, веществами, разрушающими цитоскелет, а также агентами, нарушающими функционирование аппарата Гольджи.

Вновь синтезированный фосфатидилэтаноламин появляется практически сразу после введения в клетку ³H-этаноламина или других предшественников синтеза этого фосфолипида. Таким образом, как транспорт фосфатидилэтаноламина к плазматической

мембране, так и его трансмембранный перенос — очень быстрые процессы, в которых, по-видимому, участвуют белки-переносчики.

В настоящее время выделен и полностью очищен ряд белков, обладающих специфичностью к определенным классам фосфолипидов и ускоряющих перенос или обмен фосфолипидов между органеллами в опытах *in vitro*. К этим белкам относятся фосфатидилхолин — специфический транспортирующий белок, полученный из печени быка и из печени крыс, церebroзид — транспортирующий белок, а также неспецифический транспортирующий белок печени. Несмотря на то что для некоторых транспортирующих белков выяснена структура связывающего липид активного центра, механизм функционирования этих белков *in vivo* остается неясным.

Фосфолипиды клеточных мембранных структур обновляются очень быстро. Почти половина всех фосфолипидов обновляется в ходе каждого деления клетки. При этом скорость деградации и синтеза фосфолипидов зависит от типа мембранных структур и от класса фосфолипида. Полупериод жизни клеток печени составляет 2—3 дня. Половина всех фосфолипидов внешней мембраны митохондрий обновляется через 5—6 дней, внутренней — через 8—10, а фосфолипиды мембран микросом — через 1—2 дня. При этом полупериод обмена сфингомиелина — 38 ч, фосфатидилсерина — 23, фосфатидилхолина и фосфатидиламина — около 15 ч. Наиболее быстро происходит в клетке обмен фосфоинозитидов, что в первую очередь связано с их участием в трансмембранной передаче сигнала (см. гл. VI). Как же липиды покидают мембраны? По-видимому, один из способов удаления липидов — активация эндогенных фосфолипаз. Определенную роль в процессе деструкции липидов играет и их перекисное окисление (подробнее эти процессы будут рассмотрены в гл. VIII).

Фосфолипиды плазматической мембраны могут обновляться и в результате эндоцитоза с последующим разрушением в лизосомах. Этот путь достаточно убедительно доказан для сфингомиелина плазматической мембраны фибробластов.

Метаболизм мембранных фосфолипидов в ходе биогенеза биологических мембран играет важную роль как в норме, так и при развитии ряда патологических процессов. Некоторые лекарства, яды модифицируют фосфолипидный состав биологических мембран, нарушают ход биогенеза. Особую роль обмен мембранных липидов играет в адаптации холонокровных животных к температуре окружающей среды. Так, например, ненасыщенность жирных кислот мембранных фосфолипидов рыб резко возрастает при переходе рыб из более теплой воды в холодную, а также при изменении характера и интенсивности двигательной активности.

В настоящее время мы не знаем всех механизмов, регулирующих метаболизм обмена липидов в ходе биогенеза биологических мембран. Однако кроме транспортных процессов важную роль в биогенезе мембран играют регуляция активности эндогенных фосфолипаз и процессы перекисного окисления липидов.

VII.3. БИОГЕНЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

В ходе биогенеза биомембран синтезированные в рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикулума белки транспортируются к различным органеллам клетки, к плазматической мембране. Высокая специфичность «доставки» белков к определенным мембранным структурам осуществляется цистернами аппарата Гольджи. Цистерны аппарата Гольджи организованы в стопки (рис. 63), при этом в типичных клетках млекопитающих

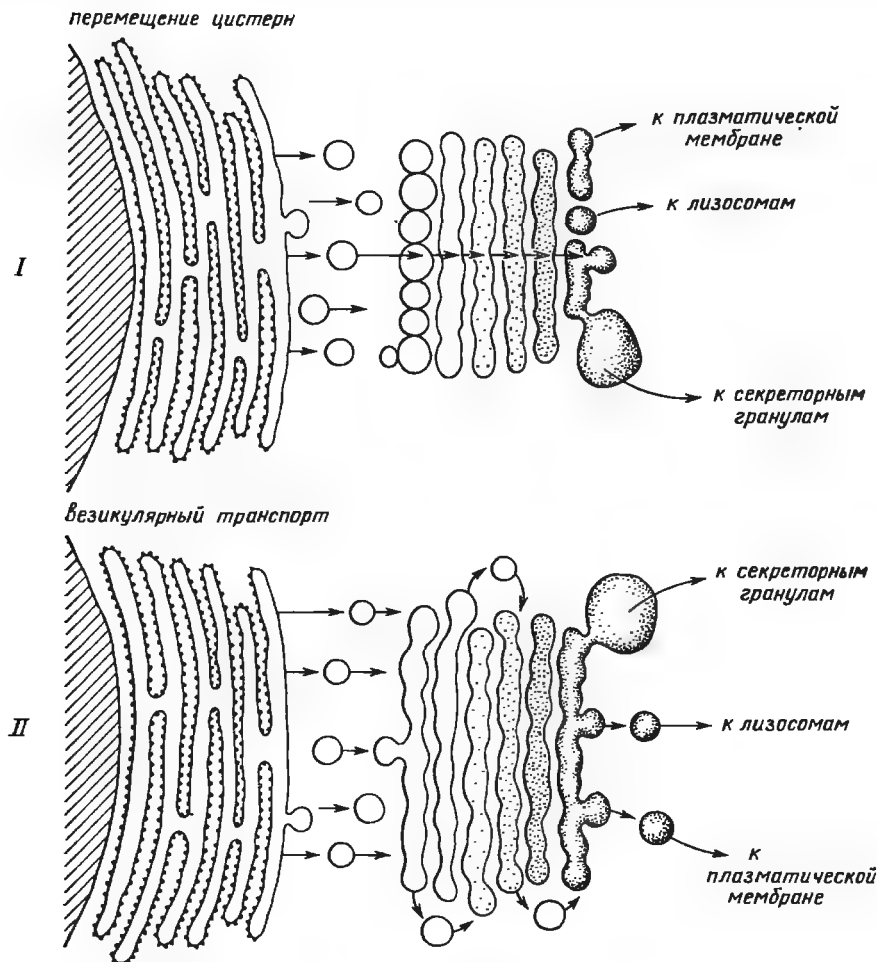


Рис. 63. Перемещение цистерн (I) и везикулярный транспорт (II) в аппарате Гольджи

в стопке, как правило, 5—6 цистерн, в клетках низших организмов и растений — 20 и более цистерн.

В аппарате Гольджи, как правило, довольно высока плотность мембранных белков, пронизывающих липидный бислой. До тех пор пока клетка не начнет делиться, цистерны аппарата Гольджи плотно упакованы и имеют уплощенную форму. До сих пор не ясны механизмы, отвечающие за уплощенную форму цистерн и обеспечивающие их характерную упаковку.

Стопка Гольджи ориентирована в клетке строго определенным образом и имеет две функционально различные поверхности. На одном конце стопки цистерны специализированы для приема везикул, содержащих вновь синтезированные гликопротеины. Это так называемая *цис*-поверхность стопки. В ходе синтеза на внешней поверхности эндоплазматического ретикулума белок либо проникает внутрь просвета сети ретикулума, либо встраивается в его мембрану. Этот процесс зависит от типа белка. После того, как сборка белка закончена, часть мембраны эндоплазматического ретикулума с вновь синтезированными белками выпячивается, образует везикулу, которая транспортируется к *цис*-поверхности аппарата Гольджи и сливается с ней (см. рис. 63). Это первый этап транспорта белка через систему аппарата Гольджи. Белок, претерпевая ряд превращений, начинает движение к *транс*-поверхности аппарата Гольджи и затем покидает его в составе липидной везикулы.

Эти структуры были открыты в 1898 г. итальянским гистологом Камилло Гольджи. Вскоре после этого было выдвинуто предположение, что в секреторных клетках эти органеллы участвуют в секреции белков, транспортируя их к поверхности клетки. Однако экспериментальные доказательства транспорта секреторных белков через аппарат Гольджи были получены только в 1960 г. Дж. Палладе из Рокфеллеровского института медицинских исследований в США. Дж. Палладе с группой коллег проследил путь белков в клетках поджелудочной железы от эндоплазматического ретикулума до секреторных гранул, покидающих клетки поджелудочной железы. Работа была выполнена с помощью комбинации радиоавтографического анализа, цитохимии и электронной микроскопии. Прохождение белков через аппарат Гольджи сопровождается присоединением к ним молекул сахаров.

Дальнейший успех в изучении аппарата Гольджи был связан с развитием методов дифференциального центрифугирования. В 1970—1980 гг. был выполнен цикл работ, позволивший получить высокоочищенные мембраны аппарата Гольджи и разделить их по плотности цистерн на три фракции. Было продемонстрировано, что в аппарате Гольджи происходят не только гликозилирование и отщепление от белков определенных молекул сахаров, но и фосфорилирование белков, присоединение к ним сульфатных групп и даже жирных кислот. Это «созревание» белков в аппарате Гольджи, получившее название процессинг, очевидно, необходимо для их сортировки и направленного транспорта. В насто-

ящее время ясно, что процессингу подвергаются не только секреторные белки, но и другие белки, синтезирующиеся в клетке и включающиеся в биогенез клеточных мембран.

VII.3.1. Пути гликозилирования белков в аппарате Гольджи

Процессинг начинается в просвете эндоплазматического ретикула, где ко всем образующимся гликопротеинам присоединяются одинаковые олигосахаридные цепи. Каждая такая цепь состоит из 14 молекул простых сахаров: двух молекул N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), девяти молекул манозы (Man) и трех молекул глюкозы (Glc) (рис. 64). В эндоплазматическом ретикулуме происходит отщепление всех трех остатков глюкозы и одного остатка манозы, после чего гликопротеины переносятся в составе везикул к *цис*-поверхности аппарата Гольджи. Таким образом, все прибывающие в *цис*-цистерны аппарата Гольджи белки имеют одинаковые олигосахаридные цепи. В *цис*-цистернах начинается сортировка белков, в результате которой олигосахариды, предназначенные для лизосом, фосфорилируются, а белки, направляемые к секреторным гранулам и плазматической мембране, претерпевают более сложное превращение — теряют ряд сахаров и присоединяют галактозу (Gal) и сиаловую кислоту (SA) (см. также раздел I.1.3).

Этот путь гликозилирования имеет несколько этапов (см. рис. 65). На первом этапе фермент маннозидаза I отщепляет 3 остатка маннозы, затем N-ацетилглюкозаминтрансфераза I присоединяет к олигосахаридной цепи остаток N-ацетилглюкозамина. Эта реакция требует энергии, поэтому она сопряжена с расщеплением макроэргической связи «вспомогательных» молекул — уридиндифосфата (UDP) либо цитидилмонофосфата (CMP). На следующих этапах происходит отщепление еще двух остатков маннозы с помощью маннозидазы II, а N-ацетилглюкозаминтрансфераза II присоединяет второй остаток N-ацетилглюкозамина. Галактозил трансферазы присоединяет галактозу, и, наконец, на последнем этапе идет присоединение сиаловой кислоты. Эти реакции также сопряжены с расщеплением макроэргической связи вспомогательных молекул (рис. 65).

В настоящее время неясно, для чего нужен такой ступенчатый путь гликозилирования и какую роль играет в сортировке и транспорте белков. Как уже упоминалось, с помощью дифференциального центрифугирования в градиенте сахарозы удалось разделить аппарат Гольджи на 3 фракции (по-видимому, возможно получение и большего числа фракций, обладающих различной плотностью) и исследовать в каждой из них активность ферментов гликозилирования. Было показано, что фракция наиболее плотных мембран содержит ферменты, катализирующие присоединение к олигосахаридной цепи фосфатных групп, фракция с промежу-

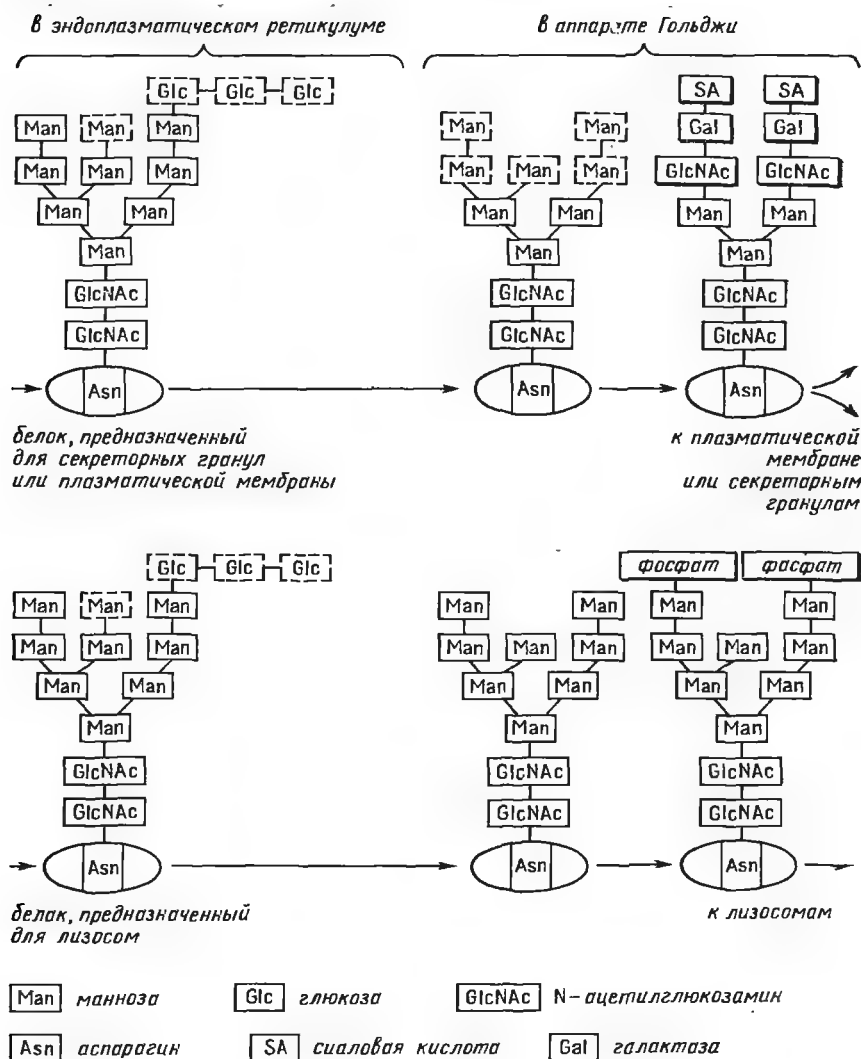


Рис. 64. Пути гликозилирования в аппарате Гольджи

точной плотностью содержит ферменты, удаляющие маннозу и присоединяющие N-ацетилглюкозамин к секреторным белкам и белкам плазматической мембраны, и последняя, наименее плотная фракция содержит ферменты, присоединяющие галактозу и сialовую кислоту.

Проследить пути гликозилирования и локализовать, в каких именно фракциях аппарата Гольджи проходят те или иные реак-

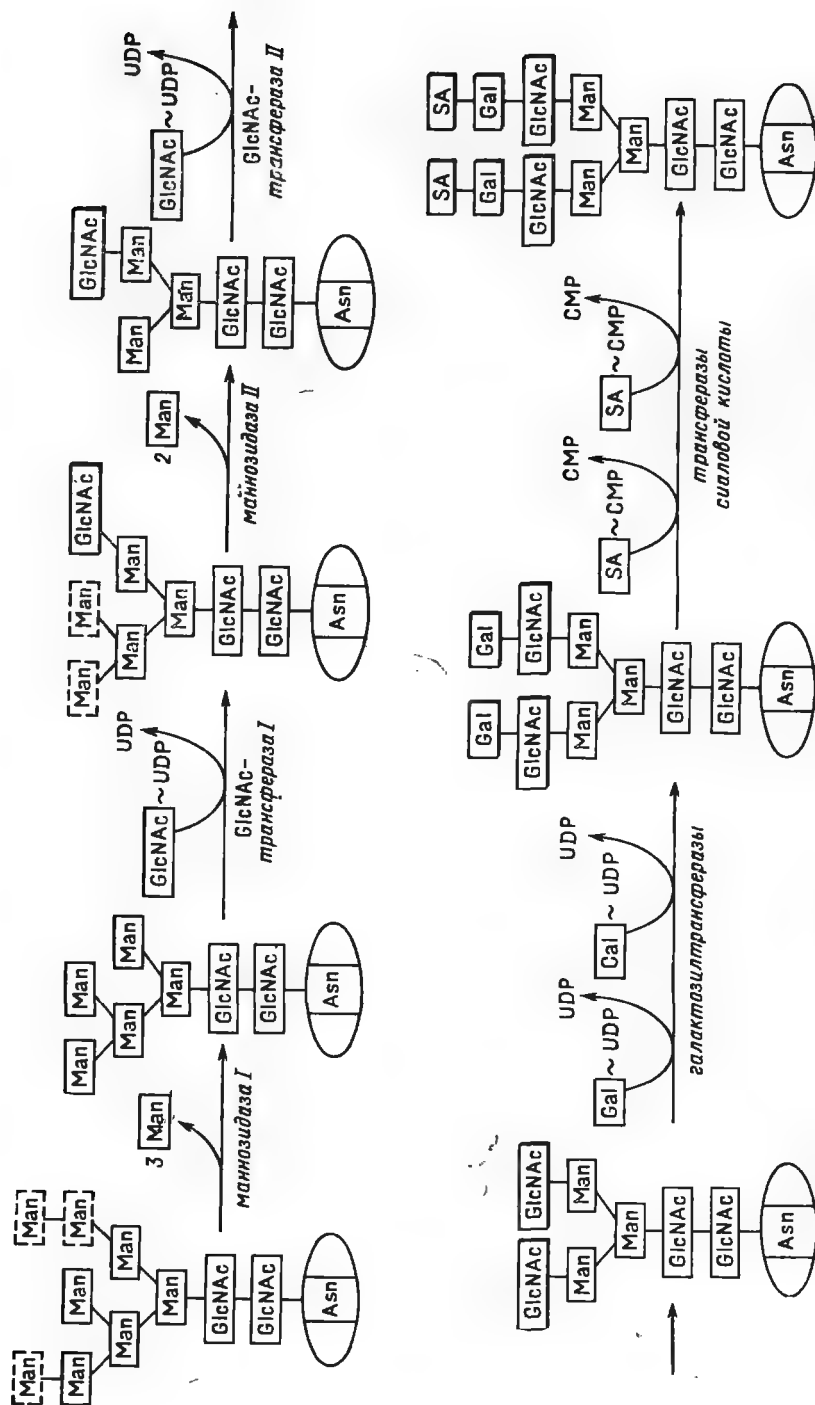


Рис. 65. Гликозилирование секреторных белков и белков плазматической мембраны (объяснения см. в тексте)

ции, удалось в результате серии остроумных экспериментов. В качестве объекта исследований была выбрана культура клеток яичника китайского хомячка. Клетки заражались вирусом везикулярного стоматита, при этом синтетический аппарат клетки переключался на производство практически единственного вирусного гликопротеина. После разрушения клеток и фракционирования аппарата Гольджи вирусные белки с удаленными первыми остатками маннозы были найдены в более плотной фракции, содержащей маннозидазу I, а белки с присоединенной галактозой — в более легких фракциях, обладающих активностью галактозилтрансферазы.

Дальнейший успех в картировании ферментов, осуществляющих процессинг белков в цистернах аппарата Гольджи, был достигнут благодаря применению специфических моноклональных антител к трансферазам, меченных радиоактивным иодом с помощью пероксидаз. Первые эксперименты были проведены на клетках печени кролика. Клетки обрабатывались так, чтобы в них могли проникнуть антитела, а затем через некоторое время фиксировались и подвергались электронной микроскопии. Выяснилось, что реакция присоединения N-ацетилглюкозамина локализована в *цис*-цистернах, а реакция присоединения галактозы — в *транс*-цистернах.

Несмотря на то что в настоящее время не получены в чистом виде ферменты, присоединяющие к олигосахаридной цепи фосфатные группировки, и, следовательно, к этим ферментам не получены моноклональные антитела, можно с достаточной уверенностью предположить, что эти ферменты локализованы в *цис*-цистернах аппарата Гольджи, имеющих максимальную плотность.

Таким образом, аппарат Гольджи можно представить в виде трех компартментов, в каждом из которых осуществляются специфические реакции процессинга. На электронно-микроскопических снимках самые «короткие» стопки аппарата Гольджи содержат четыре цистерны. Выше упоминалось, что максимальное число цистерн может превышать двадцать. Неясно, существует ли более детальная компартментализация аппарата и каковы механизмы сортировки белков, проходящих через аппарат Гольджи? Физического разделения белков не происходит, по-видимому, до тех пор, пока они не достигнут *транс*-цистерн. Очевидно, что при переходе от *цис*- к *транс*-поверхности белки должны получить химические «метки», позволяющие осуществлять их сортировку. Но неизвестно, какую роль в этом процессе играют фосфолипиды мембран цистерн аппарата Гольджи. Заманчиво предположить, что в трансмембранной передаче информации от различных цистерн аппарата Гольджи друг к другу определенная роль отводится фосфоинозитидам (см. гл. VI).

Существуют две основные модели, объясняющие переход белков от *цис*- к *транс*-поверхности стопки. Первая из них получила наименование «модели перемещения цистерн». Согласно этой модели в результате поступления новых везикул из эндоплазматиче-

ческого ретикулума к аппарату Гольджи образуется новая цистерна, которая перемещается к *транс*-стороне стопки. По мере ее перемещения одни операции процессинга сменяются другими. Достигнув *транс*-поверхности, цистерна распадается на везикулы, направленно транспортирующие прошедшие процессинг белки. Таким образом, «белки-пассажиры» не покидают «вагон-цистерну», меняются только «проводники», «обслуживающие» этих «пассажиров», и лишь после того как они покинут «вагон», проводники провожат их к месту назначения.

Каждая цистерна имеет свой биохимический состав, определенный набор ферментов, поэтому трудно представить механизм, изменяющий этот состав цистерн в ходе их перемещения. Альтернативная гипотеза предполагает, что цистерны не передвигаются, а транспортируемые белки переносятся из цистерны в цистерну с помощью липидных везикул, отпочковывающихся от цистерн с *цис*-стороны и сливающихся с последующими цистернами, постепенно перемещаясь к *транс*-стороне аппарата Гольджи, то есть «вагоны-цистерны» остаются неподвижны, а «белки-пассажиры» перепрыгивают из вагона в вагон, причем в каждом вагоне их переодевают в новые одежды, встречают по одежде и направляют в то место, где их ждут».

Дж. Э. Ротману удалось экспериментально подтвердить гипотезу «перепрыгивания», используя технику слияния мутантных и нормальных яйцеклеток китайского хомячка. Культура мутантных клеток имела генетический дефект, обуславливающий отсутствие способности присоединять к олигосахаридной цепи галактозу (эта реакция идет в *транс*-цистернах аппарата Гольджи). Несмотря на этот дефект, мутантные клетки, так же как и яйцеклетки нормальной линии, были способны транспортировать белки через стопку аппарата Гольджи.

Мутантные клетки заражали вирусом везикулярного стоматита, после чего эти клетки начинали производить вирусный гликопротеин. В мутантные и нормальные клетки вводили предшественник GlcNAc, меченый тритием, и затем клетки сливали. Вирусный гликопротеин находился только в цистернах аппарата Гольджи клеток мутантного типа, но только в цистернах клеток нормального типа к этому гликопротеину могла быть присоединена галактоза. Таким образом, если бы гликопротеин, к которому в средних цистернах присоединился меченый остаток GlcNAc, не покидал бы цистерн мутантных клеток, он был бы лишь остаток галактозы. После слияния клетки инкубировались в течение определенного промежутка времени, необходимого для передвижения гликопротеинов по цистернам аппарата Гольджи, а затем разрушались. На колонках с антителами к вирусному гликопротеину выделялся этот белок, а потом с помощью лектина-рицина осаждался гликопротеин, содержащий галактозу. Оказалось, что 50% вирусного гликопротеина содержат галактозу. Авторы считают, что этот факт можно объяснить только тем, что из срединных цистерн мутантных клеток меченый гликопротеин с равной веро-

ятностью попадал как в *транс*-цистерны нормальных клеток, так и в *транс*-цистерны яйцеклеток, лишенных способности присоединять к этому белку галактозу.

С помощью этих методов было показано, что «перепрыгивание» строго ориентировано в направлении от *цис*-поверхности к *транс*-поверхности. Белок, достигший *транс*-цистерн, не может вернуться в промежуточные или *цис*-цистерны.

По-видимому, в везикулярном транспорте определенную роль играет цитоскелет. Движение везикул с вновь синтезированными белками напоминает эндоцитоз — транспорт веществ в эндосомах (см. гл. VI). Несмотря на то что эти процессы являются важнейшими в биогенезе мембран, основные механизмы, лежащие в их основе, остаются неизвестными. Неясно, что заставляет везикулы отпочковываться от цистерн, как везикулы находят мембраны мишени, сортируя доставляемые белки, каков механизм слияния везикул с мембраной цистерны-мишени или мембраны органелл, куда транспортируется данный белок, что при этом происходит с липидами везикулы?

В настоящее время получены внеклеточные мембранные системы, в которых в присутствии АТФ удается осуществлять везикулярный транспорт между цистернами аппарата Гольджи. Тем не менее ответы на поставленные выше вопросы пока не получены.

Исследования биогенеза клеточных мембран в настоящее время интенсивно продолжаются, их результаты важны не только для понимания фундаментальных механизмов клеточной биологии, но и для решения практических задач медицины и биотехнологии.

ВОПРОСЫ

1. Как осуществляется обмен липидов в ходе биогенеза биологических мембран? Приведите экспериментальные доказательства везикулярного транспорта липидов и транспорта с помощью белков-переносчиков.
2. Как происходит разрушение липидов биологических мембран?
3. Каковы основные функции аппарата Гольджи?
4. С помощью каких экспериментов была доказана компартиментализация цистерн Гольджи?
5. Сравните две альтернативные гипотезы транспорта гликопротеинов в аппарате Гольджи. Приведите экспериментальные доказательства везикулярного транспорта. Спланируйте эксперимент, позволяющий доказать «перепрыгивание» гликопротеинов из *цис*-цистерн в промежуточные цистерны.

Глава VIII. ПАТОЛОГИЯ БИОМЕМБРАН

В основе целого ряда патологических состояний лежат изменения свойств клеточных мембран, вызываемые как факторами внешней среды, так и внутренними функциональными расстройствами. Нарушение в функционировании биомембран может быть не только причиной, но и следствием развития патологических процессов. Механизмы возникновения и развития таких наиболее распространенных патологических состояний, как *злокачественный рост, гипертония, атеросклероз*, связаны с модификацией функций биологических мембран, с нарушением структурных свойств мембранных белков и липидов. Клеточные мембраны являются мишенью действия ядов, токсинов, радиоактивного и ультрафиолетового облучения. В основе патологий иммунной системы часто лежит нарушение функций мембранных рецепторов.

На основе физико-химических и биологических исследований патологических состояний биологических мембран разрабатываются способы лечения и профилактики заболеваний, создаются высокоэффективные лекарственные препараты.

Патология биологических мембран может быть связана с модификацией мембранных липидов (изменением в соотношении липидного состава мембран; увеличением или уменьшением насыщенности жирных кислот, входящих в состав мембранных липидов; развитием перекисного окисления; изменением концентрации в мембране липорастворимых витаминов); нарушением функций мембранных белков (включая рецепторы). Как правило, патологические состояния приводят к комплексной модификации функций мембран, затрагивающей как липидный бислой, так и мембранные ферменты. В этой главе будут рассмотрены наиболее общие процессы, наблюдающиеся при патологии биомембран, и разобраны биохимические механизмы возникновения и развития ряда патологических функций мембранных структур.

VIII.1. ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

Перекисное окисление мембранных фосфолипидов является одним из наиболее распространенных механизмов деструкции мембранных структур, регистрируется при развитии целого ряда патологических состояний. Тем не менее процессы перекисного окисления липидов протекают и в нормальной клетке. Они регу-

лируются целым рядом ферментов: НАДФ(Н)-зависимыми микросомальными оксигеназами, циклооксигеназами и липоксигеназами. Продукты перекисного окисления липидов — предшественники синтеза *простагландинов*, *тромбоксанов*, *простациклина*, *лейкотриенов* и *липоксенов*.

В основе современных представлений о механизме перекисного окисления липидов лежит выдвинутая в 1887 г. гипотеза А. Н. Баха о возможности непосредственного присоединения молекулярного кислорода к органическим молекулам с образованием гидроперекисей. Субстратом окисления в биологических мембранах являются полиненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов.

Перекисное окисление липидов — сложный процесс, протекающий как в животных, так и в растительных тканях. Он включает в себя активацию и деградацию липидных радикалов, встраивание в липиды предварительного активированного молекулярного кислорода, реорганизацию двойных связей в полиненасыщенных ацилах липидов и, как следствие, деструкцию мембранных липидов и самих биомембран. В результате развития свободнорадикальных реакций перекисного окисления липидов образуется целый ряд продуктов, в том числе спирты, кетоны, альдегиды и эфиры. Так, например, только при окислении линолевой кислоты образуется, по крайней мере, около 20 продуктов ее распада. Биологические мембраны, особенно мембраны холоднокровных животных, содержат большое количество ненасыщенных жирных кислот, металлопротеины, активирующие молекулярный кислород. Поэтому неудивительно, что в них могут развиваться процессы перекисного окисления липидов.

Схематично процесс перекисного окисления липидов можно представить следующим образом. Сначала образуется липидный радикал, в результате чего формируются двойные сопряженные

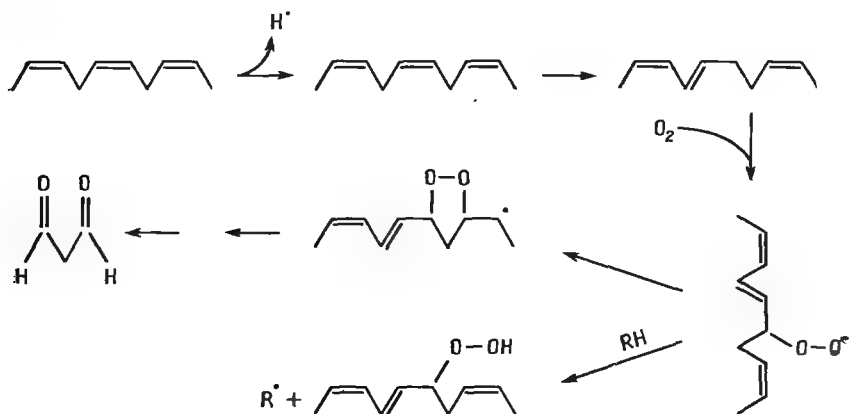


Рис. 66. Схема образования перекисей липидов

связи. Атака молекулярного кислорода приводит к образованию перекисного радикала, который может взаимодействовать с другой молекулой липида, разрушает ее с образованием нового липидного радикала. Одним из продуктов этой реакции является гидроперекись липида — сравнительно устойчивое соединение. Кроме этого из перекисного радикала может образовываться эндоперекисный радикал липида, распад которого приводит к формированию ряда продуктов, в том числе малонового диальдегида (рис. 66).

VIII.1.1. Неферментативное перекисное окисление липидов

Полиненасыщенные жирные кислоты как в свободном виде, так и в составе липидов могут претерпевать спонтанное перекисное окисление, которое с довольно высокой скоростью протекает в липидных пленках и в растворах. При этом процессы перекисного окисления могут протекать в истинных растворах, гомогенных системах, а также в водных средах, где липиды образуют липосомы и пленки, системы с различными фазами. Скорость липопереокисления зависит от природы субстрата (в первую очередь от ненасыщенности жирных кислот), от температуры, а также от присутствия в системе катализаторов. Наиболее активные катализаторы липопереокисления — ионы Fe^{2+} и аскорбиновая кислота.

Реакции неферментативного свободнорадикального липопереокисления идут по кинетике цепных процессов с разветвлением цепей. Эти свободнорадикальные реакции эффективно ингибируются антиоксидантами — веществами, способными служить ловушками радикалов. К таким соединениям относятся токоферолы, карнозин и некоторые другие природные вещества. Существует ряд синтетических агентов, также обладающих мощными антиоксидантными свойствами, среди них наиболее широко известен ионол.

Фосфолипиды в нативных мембранных системах эффективно защищены от неферментативного перекисного окисления наличием в биомембранах антиоксидантов, структурной организацией мембран, а также специальными ферментативными системами, регулирующими концентрации в мембране активных форм кислорода, ингибирующими развитие липопереокисления (подробнее об этих системах смотрите в следующем разделе).

Скорость неферментативного липопереокисления в нативных биологических мембранах, в отличие от автоокисления в гомогенных системах, не коррелирует с ненасыщенностью фосфолипидов и определяется особенностями структуры окисляемых мембран, наличием в них антиоксидантов и рядом других факторов.

По-видимому, в нативных мембранах неферментативное перекисное окисление идет по кинетике, отличной от свободноради-

кальных процессов, протекающих в жидкой фазе и сопровождающихся удлинением и разветвлением цепей. Ряд исследователей считают, что неферментативное перекисное окисление вообще не идет *in vivo* и не играет существенной физиологической роли. Тем не менее продукты неферментативного перекисного окисления регистрируются в тканях при некоторых патологических процессах. Сторонники теории развития неферментативного перекис-

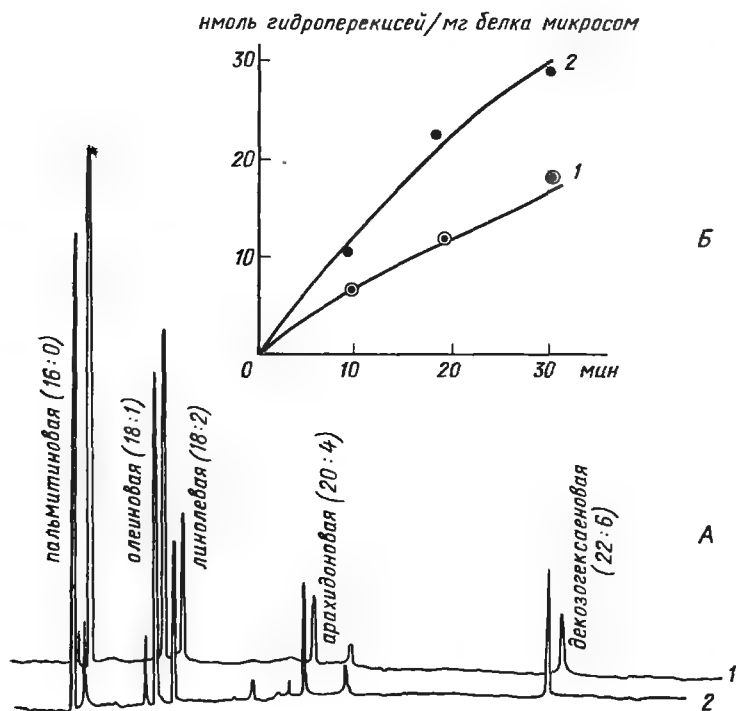


Рис. 67. Газожидкостная хроматография метилированных жирных кислот микросом печени крыс (1) и рыб (2); А, Б — кинетика неферментативного перекисного окисления микросом крысы (1) и карпа (2)

ного окисления в ходе таких патологических процессов, как злокачественный рост, поражения тканей рентгеновским облучением и другие, приводят для доказательства протекания этого процесса в тканях *in vivo* тот факт, что введение в организм антиоксидантов существенно снижает уровень липоперекисления. Однако в литературе имеются данные, убедительно доказывающие, что ряд антиоксидантов влияет как на ферментативные системы, связанные с образованием перекисей, так и на ферменты, участвующие в их утилизации.

В микросомной фракции печени существует ферментативная НАДФ(Н)-зависимая система липопереокисления. В этих же мембранных фракциях в опытах *in vitro* легко запускается неферментативное липопереокисление, индуцируемое присутствием ионов Fe^{2+} и аскорбиновой кислоты. Уровень неферментативного перекисного окисления исследован в мембранах микросом печени крыс и мышей при развитии канцерогенеза, ряда привитых опухолей, в ходе постнатального развития крыс, а также при других физиологических и патологических процессах. Как правило, уровень неферментативного перекисного окисления не претерпевает существенных изменений в ходе этих процессов. Процесс липопереокисления, как уже отмечалось, зависит от структурных факторов и свойств мембранных липидов.

Неферментативное перекисное окисление значительно интенсивней идет в микросомах печени рыб, чем крыс. Липиды рыб содержат гораздо больше полиненасыщенных жирных кислот, чем фосфолипиды мембран крыс (рис. 67). Инъекция рыбам метилхолантрена не приводит к существенному изменению жирнокислотного состава, однако существенно снижает уровень неферментативного липопереокисления за счет изменения структурной организации микросомальных мембран, вызванной индукцией в микросомах изоформ питохрома *P*-450 (см. гл. VI). Выяснение вклада неферментативного липопереокисления мембранных липидов в деструкцию мембран *in vivo* нуждается в дополнительных экспериментальных исследованиях.

При работе с липидами биологических мембран и с мембранными фракциями *in vitro* этот процесс необходимо учитывать, предпринимать систему мер, препятствующую развитию липопереокисления. Выделение липидов и мембранных фракций рекомендуется проводить в присутствии антиоксидантов на холоде. Хранить препараты, подвергающиеся липопереокислению, рекомендуется при -70°C в атмосфере инертных газов. Существенно снижается уровень липопереокисления, если к среде хранения мембранных фракций добавить 1—2% глицерина.

VIII.1.2. Ферментативное перекисное окисление липидов

Ферментативное перекисное окисление липидов протекает в мембранах эндоплазматического ретикулума и инициируется НАДФ(Н). В реконструированных системах удалось индуцировать ферментативное липопереокисление встроенным в липосомы флавопротеином — первым компонентом микросомной цепи окисления (см. гл. VI). В основе инициации ферментативного липопереокисления лежит активация кислорода в ходе переноса элементов от НАДФ(Н) к флавопротеину. Тем не менее активные формы кислорода могут в определенных условиях образовываться на цит. *P*-450. В ходе функционирования цитохром *P*-450 мо-

жет производить не только перекиси липидов, но и перекись водорода, которая эффективно инактивирует цит. Р-450. Это свойство позволило А. И. Арчакову назвать семейство цит. Р-450 «ферментами-самоубийцами» (подробнее о механизме саминактивации цит. Р-450 смотрите ниже).

Сравнительно недавно были открыты специфические ферменты, осуществляющие ферментативное перекисное окисление липидов. Сначала эти ферменты были обнаружены в растениях, а затем в некоторых животных тканях. Липоксигеназы животных (впервые обнаруженные в ретикулоцитах), в отличие от растительных липоксигеназ, окисляют не только незэстерифицированные полиненасыщенные жирные кислоты, но и полиеновые кислоты, входящие в состав фосфолипидов. При этом добавление к мембранным препаратам фосфолипазы A_2 резко усиливает липоперекисление. По-видимому, активация эндогенных фосфолипаз является одним из механизмов регуляции липоперекисления *in vivo*.

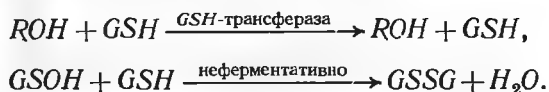
Как уже упоминалось выше, ферментативный синтез перекисей липидов играет важную роль, поскольку предшествует образованию биологически активных соединений. Свободные полиненасыщенные жирные кислоты могут окисляться по двум независимым путям: циклогеназному и липоксигеназному. Так, например, при циклогеназном окислении архидоновой кислоты образуются циклические эндоперекиси — простагландины G_2 и H_2 , служащие метаболическими предшественниками различных классов простагландинов (PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2), тромбоксанов (TXA_2 , TXB_2) и простациклина (PGI_2). При липоксигеназном окислении архидоновой кислоты образуются алифатические гидроперекиси — гидропероксиэйкозатетраеновые кислоты — промежуточные продукты биосинтеза лейкотриенов. Все субстраты циклооксигеназ являются и субстратами липоксигеназ. Жирные кислоты, которые не способны превращаться в циклические эндоперекиси, окисляются циклооксигеназами лишь до стадии липоксигеназных продуктов, при этом предполагается, что субстрат на начальных стадиях циклооксигеназного и липооксигеназного путей окисляется идентично, образуя одинаковые промежуточные свободнорадикальные продукты.

По-видимому, существует взаимосвязь между циклооксигеназной и липооксигеназной системами. Эти ферменты обнаруживаются в одних и тех же тканях, имеют общие специфические ингибиторы (например, эйкозатетраеновая кислота), а их селективные ингибиторы, как правило, угнетают обе реакции, но действуют в различных концентрациях.

Процессы липоперекисления опасны для клетки, так как их развитие ведет к патологии мембран. Поэтому кроме антиоксидантов в клетке имеются специальные ферментативные системы, регулирующие уровень липоперекисления.

В микросомах печени наряду с синтезом перекисей липидов происходит и их утилизация, так как цитохром Р-450 может выступать в роли пероксидазы. Глутатионтрансферазы могут восста-

навливать органические гидроперекиси, в том числе гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот:



Кроме того, в цитозоле клеток содержатся восстанавливающие перекиси липидов глутатионпероксидазные системы. Существуют ферментативные системы, утилизирующие активные формы кислорода (супероксиддисмутаза), инактивирующие перекисные радикалы (рис. 68).

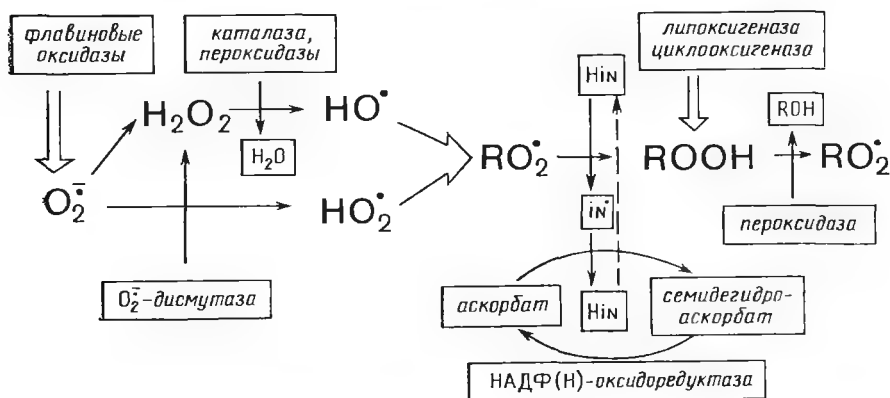


Рис. 68. Схема генерирования и утилизации активных форм кислорода и перекисей липидов ферментативными системами тканей млекопитающих (Ланкин, 1985)

В нормально функционирующей клетке уровень утилизации липопероксидов значительно превышает уровень активности систем, генерирующих липоперекисление.

Активность циклооксигеназ и липоксигеназ регулируется продуктами их реакции; небольшие количества перекисей активируют эти ферменты, в то время как накопление продуктов перекисного окисления в значительных количествах может приводить к необратимому ингибированию как циклооксигеназ, так и липоксигеназ. Таким образом, в клетке существует еще и авторегуляция ферментативного перекисного окисления липидов. Однако уровень липоперекисления в тканях *in vivo* может быть очень значительным, играть существенную физиологическую роль. Ферментативное перекисное окисление липидов наряду с активацией фосфолипаз, по-видимому, является универсальным механизмом разборки старых и ненужных мембранных структур.

В ходе биогенеза биологических мембран идет непрерывное обновление мембранных липидов (см. гл. VII). В определенных условиях в клетке интенсифицируется синтез мембранных структур, например при индукции микросомных монооксигеназ наряду с ростом количества цит. Р-450 происходит значительное увеличение в клетках печени мембран эндоплазматического ретикулума. Ю. П. Козловым с группой сотрудников в середине 70-х годов было показано, что процесс роста количества мембран сопровождается падением уровня перекисей липидов, а разборка мембран ведет к интенсификации липопереокисления (рис. 69). Процесс разборки может быть приостановлен введением в организм антиоксидантов, ингибирующих липопереокисление.

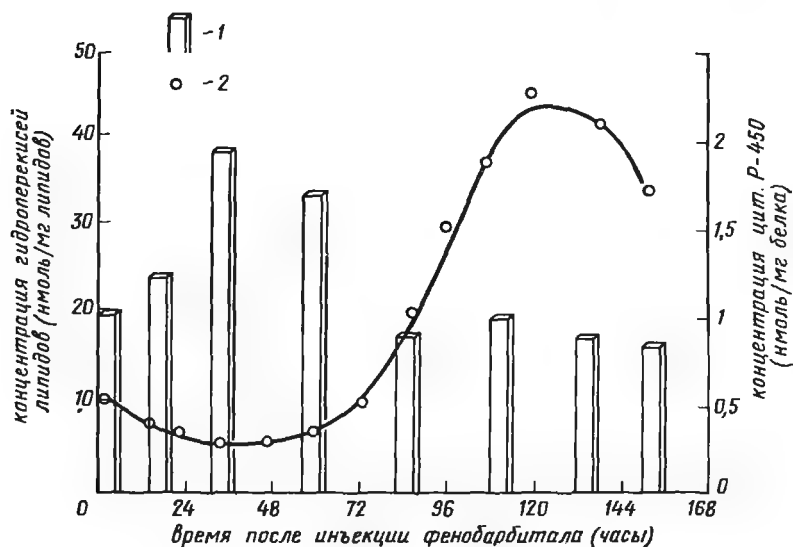


Рис. 69. Изменение концентрации цит. Р-450 (1) и гидроперекисей липидов (2) в мембранах микросом в ходе индукции и последующей разборки мембран

С процессом обновления мембран, по-видимому, связана и интенсификация ферментативного липопереокисления, зарегистрированная в микросомах печени крыс в ходе постнатального развития. При этом максимум ферментативного перекисного окисления приходится на период максимального роста животных (2 месяца — пубертатный период).

VIII.1.3. Механизмы повреждения мембранных структур при перекисном окислении липидов

Перекисное окисление липидов может приводить к повреждению или модификации всех основных функций биологических мембран: барьерной, рецепторной, каталитической. Принято рассматривать по крайней мере 3 основных первичных механизма повреждения биомембран в результате инициации перекисного окисления липидов.

1. В результате появления гидрофильной гидроперекисной группировки в полиненасыщенной жирной кислоте, входящей в состав мембранного фосфолипида, нарушается гидрофобность фосфолипидного бислоя, резко увеличивается его пассивная проницаемость для ионов.

2. Образующиеся в ходе липоперекисления диальдегиды типа малонового обладают свойствами поперечносшивающих бифункциональных реагентов. Они способны приводить к полимеризации и агрегации биомолекул (белков и липидов в мембранах), накоплению липофусциноподобных соединений.

3. Перекисные радикалы осуществляют окисление аминокислотных остатков (в первую очередь SH-содержащих: гистидина, триптофана и др.) мембранных белков, в том числе остатков, локализованных в активном центре ферментов, что приводит к утрате ферментативной активности.

Эти три первичных модифицирующих эффекта активных форм кислорода и липидных радикалов обуславливают многообразные проявления перекисного окисления как на уровне молекулярной и ультраструктурной организации биомембран, так и в отношении их функциональных характеристик. Наиболее типичными из них являются: ограничение молекулярной подвижности фосфолипидов и появление «перекисных кластеров» в липидном бислое, уменьшение количества жидких липидов в микроокружении мембранных белков и нарушение липид-белковых взаимодействий, устранение характерной для нативных мембран трансбислойной асимметрии липидов, уменьшение толщины гидрофобной зоны мембран и усиление трансмембранной миграции интегральных белков, появление каналов проницаемости для ионов, снижение каталитической активности и термостабильности мембранных белков, снижение электрической прочности мембран (уменьшение потенциала пробоя), их дезинтеграция и фрагментация. Эти проявления патологии мембран, вызываемые липоперекислением, разберем подробнее на примере саркоплазматического ретикулула миоцитов.

При индукции перекисного окисления липидов в саркоплазматическом ретикулуле мышечных клеток нарушается механизм «накачки» кальция в цистерны. Величина $\text{Ca}^{2+}/\text{АТФ}$ снижается по мере накопления продуктов липоперекисления до 0. В основе этого эффекта лежит резкое увеличение проницаемости мембран саркоплазматического ретикулула для кальция.

Каталитическая активность Са-АТФазы значительно более устойчива к индукции липоперекисления, ингибирование ее наступает только на поздних стадиях липоперекисления и, по-видимому, обусловлено появлением межмолекулярных белковых сшивков.

Саркоплазматический ретикулум — основной регулятор уровня Ca^{2+} в саркоплазме миоцитов, повреждение системы транспорта Ca^{2+} должно приводит к появлению избыточных концентраций Ca^{2+} и, как следствие, к возникновению мышечных контрактур.

Подобные процессы могут наблюдаться и *in vivo*. Было показано, что перекисное окисление липидов интенсифицируется в мышечной ткани при тяжелых физических нагрузках. При этом повреждаются эритроциты и мышечные клетки, в результате чего высвобождаются Fe-содержащие белки — гемоглобин и миоглобин — эффективные катализаторы распада H_2O_2 с образованием $\text{OH}^\cdot$ -радикалов и продуктов перекисного окисления липидов. Примером такого высвобождения гемсодержащих белков при истощающей физической нагрузке может служить «анемия бегунов», характерная для марафонцев. При физической нагрузке снижается отношение АТФ/АДФ, происходит накопление пуринов (гипоксантина), являющихся субстратами ксантиноксидазы, что может приводить к повышенной продукции $\text{O}_2^\cdot$ -радикалов, а следовательно, и к активации липоперекисления.

Увеличение в выдыхаемом воздухе пентана (одного из продуктов перекисного распада жирных кислот) при сильных мышечных нагрузках свидетельствует об интенсификации липоперекисления. При определении содержания пентана в выдыхаемом воздухе у 15 нетренированных практически здоровых мужчин в возрасте 20—23 лет до физической нагрузки, а также в различные сроки после нее (работа на велоэргометре с частотой вращения педалей 60 об/мин, мощность нагрузки 1500 кгм/мин до произвольного отказа) установлена активация липоперекисления, которая достигает максимума через 2 ч после произвольного отказа от нагрузки. Наиболее выраженная активация липоперекисления, являющаяся конечным результатом развивающегося окислительного стресса, регистрируется не сразу после произвольного отказа от физической нагрузки, а по прошествии двух часов и сохраняется еще в течение четырех часов (Каган и др., 1982).

Развитие липоперекисления мембранных липидов, возникающее при физических перегрузках, а также при некоторых других патологических состояниях может быть с достаточной эффективностью предотвращено введением в организм дополнительных доз природного антиоксиданта — витамина Е. Витамин Е увеличивает выносливость спортсменов, особенно в высокогорных условиях, улучшает утилизацию кислорода путем повышения эффективности окислительных процессов в митохондриях.

При экспериментальном Е-авитаминозе, вызываемом у крыс специальной диетой, удается обнаружить изменение проницаемости саркоплазматического ретикула и наблюдать целый ряд

физиологических последствий развития в мембранах миоцитов липоперекисления.

Повреждение мембран саркоплазматического ретикулула в результате перекисного окисления липидов — лишь один из примеров патологии мембранных структур, возникающих в результате модификации мембранных фосфолипидов активными формами кислорода. Интенсификация процессов перекисного окисления лежит в основе целого ряда патологических состояний. На основе химических соединений, обладающих антиоксидантным действием, разрабатываются лекарственные препараты, успешно применяющиеся в медицинской практике.

VIII.2. ПАТОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН, СВЯЗАННЫЕ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Нарушение проницаемости биологических мембран может быть вызвано не только модификацией липидного бислоя, но и изменением свойств мембранных белков, осуществляющих ионный транспорт и участвующих в его регуляции.

Примером такого рода патологии может служить гипертоническая болезнь. В 1975 г. Ю. В. Постновым была выдвинута гипотеза, согласно которой в основе механизма инициации гипертонического состояния лежит функциональное нарушение ион-транспортных систем клеточных мембран тканей мезенхимального происхождения. До этого причины гипертонической болезни связывались исключительно с нарушением функций почек, нервной и гуморальной регуляции артериального давления.

Основные успехи в исследовании биохимических механизмов этиологии и патогенеза гипертонической болезни были получены при использовании в качестве объекта исследования специальной линии крыс со спонтанной гипертензией (*spontaneously hypertensive rats (SHR) Okamoto-Aoki strain*), которая имеет большую патогенетическую общность с гипертонической болезнью человека. Работы по исследованию транспортных функций клеточных мембран на этой модели были начаты в 1973 г. и выявили нарушение трансмембранного транспорта ионов калия и хлора в гладкомышечных клетках аорты. Позднее К. Локи с соавторами отметили у этих животных уменьшение Ca^{2+} -транспортующей способности неочищенной мембранной фракции микросом из клеток аорты и миокарда. Тем не менее интерпретация этих нарушений мембранных ион-транспортных систем как первичных по отношению к патогенезу гипертензии была затруднена. Действительно, эти результаты были получены на сократительных клетках, подвергавшихся при развитии гипертонии функциональной перегрузке и гипертрофии, что позволяло предположить вторичность мембранной патологии, прямо не связанной с механизмом возникновения гипертонии.

Дефекты структурно-функциональной организации плазматической мембраны клеток, проявляющиеся при первичной артериальной гипертензии (Постнов, Орлов, 1987)

Мембранные нарушения	Тип ткани	
	спонтанная гипертензия крыс (SHR линии Окамото-Аоки)	гипертоническая болезнь (эссенциальная гипертензия)
1	2	3
Повышение проницаемости плазматической мембраны для Na^+	гладкие мышцы сосудов, эритроциты	эритроциты
Частичная деполяризация мембраны	гладкомышечные клетки сосудов, синапсомы, тромбоциты	тромбоциты, эритроциты
Понижение Са-связывающей способности плазматических мембран	эритроциты, гладкие мышцы, адипоциты, кардиомиоциты, синапсомы, гепатоциты	эритроциты
Нарушение АТФ-зависимого, стимулируемого кальмодулином транспорта Ca^{2+}	эритроциты, синапсомы, кардиомиоциты	эритроциты, тромбоциты
Увеличение содержания внутриклеточного натрия	эритроциты, лимфоциты, гладкие мышцы сосудов	эритроциты, лейкоциты
Нарушение внутриклеточного распределения кальция	сосудистые гладкие мышцы, адипоциты	адипоциты
Повышение концентрации свободного кальция в цитоплазме	эритроциты, тромбоциты	эритроциты, тромбоциты
Нарушение процесса выделения и захвата медиаторов	синапсомы	тромбоциты

Наиболее убедительные доказательства первичности механизмов модификации мембранных систем в патогенезе гипертонической болезни были получены в работах Ю. В. Постнова и С. Н. Орлова, проведенных сначала на эритроцитах крыс линии SHR (Постнов и др., 1957), а затем и на эритроцитах людей с гипертонической болезнью. Простота организации эритроцита позволила изучать функциональные свойства плазматической мембраны без помех, которые вносят внутриклеточные мембраны структуры, а также избежать искажений мембранных функций, которые могут возникать вторично в связи с усилением сократительной активности клеток. Начиная исследование мембран эритроцитов крыс линии SHR, Ю. В. Постнов и С. Н. Орлов показали, что в мембране эритроцитов отражаются изменения мембранной функции, характерные для первичной гипертензии.

Вначале при спонтанной гипертензии крыс, а затем при гипертонической болезни в эритроцитах людей было показано увеличение скорости равновесного Na/Na -обмена. В дальнейшем выяснилось, то эффект связан как с нарушением в системах антипорта

так и в системах котранспорта одновалентных катионов. Работа транспортных систем плазматической мембраны регулируется ионами кальция (см. гл. III). Оказалось, что нарушение транспорта одновалентных катионов в мембране эритроцитов сопряжено с уменьшением ее Са-связывающей способности, обусловленной сокращением числа мест связывания кальция на внутренней поверхности мембраны (Орлов, 1980). Аналогичные нарушения связывания плазматической мембраной Ca^{2+} позднее были обнаружены не только в эритроцитах, но и в других клетках крыс линии SHR и людей с гипертонической болезнью. При дальнейшем изучении Ca^{2+} -транспортирующих систем плазматических мембран крыс линии SHR были показаны существенные отклонения в АТФ-зависимом, стимулируемом кальмодулином транспорте кальция как в эритроцитах, так и в синапсоммах головного мозга, отмечено снижение трансмембранного потенциала плазматической мембраны и т. п. (табл. 23).

Ряд мембранных дефектов проявляется ранее, чем возникает сам феномен повышенного давления. Таким образом, результаты этих исследований показали, что гипертоническая болезнь представляет собой своеобразную мембранную патологию. Исследования мембранных нарушений при гипертонической болезни продолжаются, предпринимаются попытки обнаружить и клонировать белковые факторы, определяющие мембранные дефекты, проанализировать их и генетическую природу. Ниже представлена схема, суммирующая современные представления о влиянии дефектов биомембран на патогенез гипертонии.



VIII.3. ПАТОЛОГИИ БИОМЕМБРАН, СВЯЗАННЫЕ С НАРУШЕНИЕМ МЕХАНИЗМОВ ТРАНСМЕМБРАННОЙ ПЕРЕДАЧИ ИНФОРМАЦИИ

В разделе VI.1 были рассмотрены механизмы трансмембранной передачи информации с участием G-белков и мембранных фосфоинозитидов. Механизм передачи, основанный на метаболизме фосфоинозитидов, вызывает большой интерес, потому что пути сигналов здесь могут раздваиваться. Как уже упоминалось, одним из продуктов гидролиза фосфатидилинозит-4,5-дифосфата является инозитолтрифосфат, а другим — диацилглицерин (см. рис. 51). Это вещество остается в мембране и функционирует как вторичный мессенджер, активируя связанную с мембраной протеинкиназу — C-киназу. Вклад каждой ветви пути этого сигнала может быть промоделирован. В качестве агентов, моделирующих действие диацилглицерина, используются форболовые эфиры (см. рис. 52). Оказалось, что форболовые эфиры — промоторы канцерогенеза, эффективно способствуют опухолевому росту.

С другой стороны, было показано, что с помощью форболовых эфиров и кальциевого ионофора можно инициировать в клетках синтез ДНК. С этих позиций злокачественный рост клеток можно рассматривать как мембранную патологию, где причиной образования и развития опухоли является нарушение механизмов передачи сигнала от плазматической мембраны к ядру. Было высказано предположение, что форболовые эфиры способствуют опухолевому росту, вероятно, потому, что активируют диацилглицериновую ветвь инозитидного сигнального пути.

Дифференцировка и размножение клеток в организме во многом регулируются определенным классом веществ — факторами роста. Эти вещества выделяются одними группами клеток для стимуляции размножения других. Как действуют факторы роста на клетки, в настоящее время окончательно не ясно. Однако, по-видимому, обязательной стадией в механизме запуска клеточного деления должны быть взаимодействие фактора роста с рецептором плазматической мембраны клетки и передача информации от мембраны к ядру.

В настоящее время в литературе обсуждаются по крайней мере два пути передачи сигнала. Первый путь реализуется при действии таких веществ, как инсулин и эпидермальный фактор роста (EGF — epidermal growth factor). Действие этих факторов обусловлено взаимодействием их с рецепторами, активирующими мембранную тирозинкиназу (протеинкиназу, фосфорилирующую белки по остатку тирозина). Эта реакция включает каскад последовательных фосфорилирований, в результате которых сигнал передается к ядру, после чего включается синтез ДНК (рис. 70). Второй путь передачи сигнала осуществляется через фосфоинозитидный цикл. Примером веществ, действующих по этому пути, может служить фактор роста тромбоцитов (PDGF—platelet—derived growth factor). PDGF стимулирует гидролиз фосфатидилинозит-

4,5-дифосфата с образованием вторичных мессенджеров — инозитолтрифосфата и диацилглицерина, которые включаются в процессы G-фазы клеточного цикла, подготавливая клетку к делению. Предполагается, что инозитолтрифосфат вызывает мобилизацию внутриклеточного кальция, а диацилглицерин активирует протеинкиназу C, которая в свою очередь приводит в действие мембранный механизм, регулирующий транспорт одновалентных ионов. При этом наблюдаются модификация Na/H-обмена, закисление внутренней среды клетки и т. д.

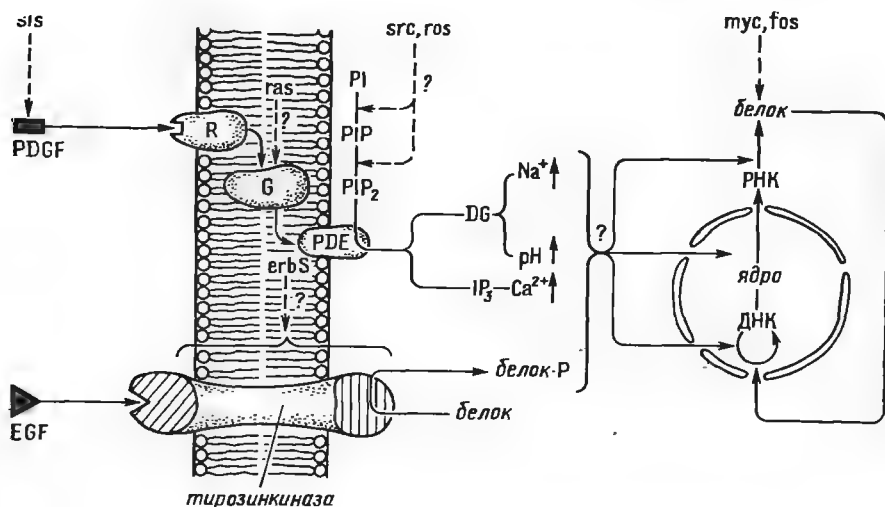


Рис. 70. Влияние белков, кодируемых онкогенами, на регуляцию размножения клеток (объяснение в тексте)

На сегодняшний день, однако, неясно, как все эти процессы связаны с включением синтеза ДНК и РНК. Естественно, что они находятся под контролем специальных генов. Нарушение в работе этих генов приводит к аномалиям, вызывающим неконтролируемый рост клеток. В настоящее время идентифицировано более 25 генов, неправильное функционирование которых приводит к опухолевому росту. Ряд этих генов, получивших название онкогены, определяет синтез белков, участвующих в механизме трансмембранной передачи сигнала, или белков, которые могут включаться в этот механизм и нарушать процесс передачи информации.

Было показано, что онкоген, получивший наименование *sis*, контролирует синтез фактора роста из тромбоцитов, онкоген *erbB* кодирует белок, идентичный по структуре рецептору EGF. Этот рецептор состоит из трех функциональных частей. Первая часть,

выступающая на внешнюю поверхность мембраны, содержит домен, связывающий EGF, средняя часть пронизывает мембрану, а обращенный внутрь клетки фрагмент обладает тирозинкиназной активностью. Белок, кодируемый *erb b*, не имеет внешней части, связывающей EGF, и по предположению ряда авторов, может инициировать синтез ДНК в отсутствие фактора роста, что и должно приводить к малигнизации клетки.

Другой активный в раковых клетках онкоген — *ras* — кодирует мембранный белок, который обладает свойствами G-белка. Он способен связывать и гидролизовать ГТФ. Предполагается, что кодируемый *ras* белок может занимать место между рецепторами фактора роста и соответствующими фосфодиэстеразами, продуцирующими фосфатидилинозит-4,5-дифосфат и диацилглицерин.

В фосфоинозитидный путь передачи сигнала включаются еще два онкогена — *src* и *mos*. Согласно ряду данных, кодируемые ими ферменты участвуют в превращении фосфатидилинозита в фосфатидилинозит-4,5-дифосфат, т. е. в возобновлении предшественника вторичных мессенджеров.

Ряд онкогенов (например, *myc* и *fos*) могут участвовать в кодировании ядерных белков, которые, по-видимому, непосредственно участвуют во включении механизма синтеза ДНК.

Таким образом, несмотря на то что механизм запуска синтеза ДНК с помощью белков, кодируемых онкогенами, окончательно неясен, можно с достаточной уверенностью сказать, что эти белки включаются в механизм трансмембранной передачи сигнала, модифицируют его и осуществляют малигнизацию клетки.

ВОПРОСЫ

1. *Какую роль ферментативное и неферментативное перекисное окисление липидов играет в патологии биологических мембран?*
2. *Как регулируются процессы перекисного окисления липидов в клетке?*
3. *Каковы основные механизмы повреждения биомембран перекисным окислением липидов?*
4. *Приведите экспериментальные доказательства того, что нарушение в регуляции трансмембранного переноса ионов лежит в основе гипертонической болезни.*
5. *Как регулируется рост клеток и как белки, кодируемые онкогенами, нарушают эту регуляцию?*

ЛИТЕРАТУРА

- Биохимия мембран/Под ред. А. А. Болдырева. М., 1986—1990. Кн. 1—8.
- Веренинов А. А., Марахова И. И. Транспорт ионов у клеток в культуре. Л., 1986.
- Кагава Я. Биомембраны. М., 1985.
- Каган В. Е., Орлов О. Н., Прилипко Л. Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов//ВИНИТИ. Итоги науки и техники. Сер. биофизика. М., 1986. Т. 18.
- Конев С. В. Структурная лабильность биологических мембран. Минск, 1987.
- Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Л., 1981.
- Левицкий Д. О., Лебедев А. В. Антибиотики в липидном бислое: переносчики и каналоформеры (полиэфирные антибиотики)//ВИНИТИ. Итоги науки и техники. Сер. биофизика. М., 1988. Т. 23.
- Марголис Л. Б., Бергельсон Л. Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками. М., 1986.
- Постнов Ю. В., Орлов С. Н. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран. М., 1986.
- Скулачев В. П. Энергетика биологических мембран. М., 1989.
- Твердислов В. А., Тихонов А. Н., Яковенко Л. В. Физические механизмы функционирования биологических мембран. М., 1987.
- Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. М., 1986.
- Halliwel B., Gutteridge J. M. C. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford, 1985.
- Hausley M. D., Stanly K. K. Dynamics of Biological membranes. N. Y. 1984.
- Racker E. Reconstructions of transporters, Receptors and Pathological States. N. Y., 1985.

RESUMEN

Al manual: «Introducción a la Membranología».

A. A. BOLDYREV, S. V. KOTELEVSEV, M. E. LANIO, C. ALVAREZ y P. PEREZ

El presente manual sistematiza la información contemporánea sobre la estructura, los principios de funcionamiento de las membranas biológicas y de los sistemas enzimáticos asociados a ellas. En el material se exponen los mecanismos fundamentales de transporte de diferentes compuestos a través de la membrana, la bioenergética de las membranas, el funcionamiento de los receptores de membrana y también se presenta de que manera tiene lugar la destoxificación de los compuestos extraños en el sistema de monoxigenasas de membrana. Así mismo, en el manual se dan a conocer ejemplos de las patologías de las biomembranas y se describen los mecanismos enzimáticos y no enzimáticos de la peroxidación lipídica. En el material están contenidos, no sólo, los fundamentos teóricos de la membranología sino también algunas aproximaciones concretas para la resolución de problemas en la biotecnología, la medicina y en la conservación del medio ambiente.

El manual puede resultar de utilidad para estudiantes de bioquímica y físico-química de las membranas biológicas, así como para aquellos especialistas que requieren elevar su calificación profesional en los campos de la biotecnología, la bioquímica y la físico-química en biología.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- А** 23187 84, 94, 152
 Аденилатциклаза 143
 Адrenoксин 134
 α -Актинии 25
 Аламетиции 84
 Аллостерия 48
 Амфитропные белки 24, 25
 Амфотерицин В 84
 1-Анилин, 8-нафталисульфонат (АНС) 81
 Анкерин 23, 25, 26
 Аннулярные липиды 22, 43
 Антибиотики 83
 Аппарат Гольджи 5, 26, 30, 172, 177
 Арахидоновая кислота 17, 18
 Арестин 161
 Асимметрия бислоя липидного 31, 40
 Атеросклероз 45
 АТФазы 110
 Са-зависимая 113—114
 Na, K-зависимая 102, 110, 114
 E_1/E_2 -типа 110
 F-типа 115—117
 P-типа 110—114
 V-типа 114—115
 транспортные 102
 Н-АТФ-синтеза 128
 N-ацетилглюкозамин 139
 Ацетилхолинэстераза 23

Бактерии галофильные 11
 Бактериородопсин 22, 42, 122
 Батрахотоксин 102
Белки
 амфитропные 24, 25
 биотопические 22
 G-белки 146
 интегральные 44
 политопические 22, 91
 рецепторы 23
 цитоскелета эритроцитов 56
 Белок-липидные комплексы 41
 Биогенез мембран 172, 177
 Биомембраны, липидный состав 17
 Бифитанильные диацилглицеротетра-
 эфир 5, 10
 α -Бунгаротоксин 166

Валиномицин 83
Витамин Е α -токоферол 194
 Вращательной корреляции время 81

Галородопсин 125
 Ганглиозиды 9
 Гетерополисахариды 59
 Гидроксирование 134
 Гидроксиметилглутарил-КоА-редук-
 таза 20
 Гипертоническая болезнь 185, 195

 Гиперхолестеринемия 45
 Гистерезис липидов 75
 Гликозилирование 24, 28, 29, 178
 Гликокаликс 57
 Гликоконъюгаты 26, 27
 Гликолипиды 6, 9, 17, 26, 27
 Гликопротеины 21, 26, 27
 Гликофории 25, 27
 Глицерофосфолипиды 74
 Глюкозидазы 30
 Градиент гибкости мембранного би-
 слоя 40
 Грайанотоксин 102
 Грамицидин 22, 84
 График Аррениуса (характеристика
 микровязкости мембран) 50
 Гуанилатциклаза 143

 Десатуразы 16
 Диацилглицерин 10, 24, 143, 152
 Дeterгенты 87
 классификация 89
 принцип действия 91
 2,4-Динитрофенол 84
 Диольные фосфолипиды 9
 Дисперсия оптического вращения 73
 Дифитанилфосфатидилглицерин 13
 Дифференциальная сканирующая ка-
 лориметрия 73
 Дыхательная цепь 127

Е-авитаминоз 194

Желчные кислоты 45
Жирные кислоты 14, 15, 17, 33
 влияние на подвижность компонен-
 тов бислоя 71, 74
 индекс ненасыщенности 52
 номенклатура 16

Злокачественный рост 185, 198

Имидазол 93
 Инозитолтрифосфат 143
 Интегральные белки 21
 Ионофоры 82, 94
 Ишемическая болезнь сердца 45

Кальмодулин 83, 197
Кальциевые каналы (Са-каналы)
 147, 152
 Каналообразователи 82, 86
 Каналы потенциалзависимые 101
 Кардиолипин 9
 Киназы (протенинкиназы)
 А-типа 143
 С-типа 143, 198
 G-типа 143
 Кастеры липидов 32, 33

- Коиформеры 32
- Коэнзим Q 128
- Коэнзим Q-цитохром с-редуктаза 127
- Креатинкиназа 48
- Критическая концентрация мицеллообразования 89
- Круговой дихроизм 73
- Ксенобиотики 136
- Ламеллярные структуры 34, 36
- Латентная активность ферментов 67, 94
- Латеральная подвижность белков в мембране 50
- Лецитин 9
- Лизолецитин 17
- Линейный дихроизм 124
- Липидпереносящие белки 86
- Липиды
 - аннулярные 22, 43
 - гексагональная фаза 34
 - динамическая подвижность в бислое 52
 - образование кластеров в бислое 32, 33
 - прокариот 11
 - фазовый переход в мембране 97
- Липопротеины 45, 47
- высокой плотности 45, 47
- низкой плотности 47, 169
- особо низкой плотности 47
- Маннозидаза 30
- Мезосомы 127
- Мембраны
 - бактериальных клеток 58
 - биогенез 177
 - искусственные 60
 - растительных клеток 58
 - хлоропластов 54
- Мембранные
 - АТФазы 23
 - белки 21
 - детергенты 87
 - липиды 6
- рецепторы 142
 - ферменты (реконструкция) 43
 - фракции (характеристика) 64
- Мембранотропные соединения 82
- Метаболон 52
- Мессенджеры вторичные 142, 153
- Метилазы 40
- Микровязкость мембран 40, 52, 78
- Микросомы 5
- Микросомное окисление 133
- Микротрубочки 5, 57
- Микрофибриллы 5
- Микрофиламенты 25, 27
- Мониторинг 140
- Моноклональные рантитела 124
- Моноксигеназные реакции 133
- Митохондрии 5
- Мицеллярные структуры 34
- Монотопические белки 22
- НАДН-СоQ-редуктаза 127
- НАДН-цитохром Р-450 редуктаза 135
- Na, K-АТФаза 155
- Нактины 155
- Негемовое железо 127
- Нейропептиды 27, 168
- Нигерицин 84
- Никотиновые рецепторы 165
- Нитрозоамины 138
- Обмен веществ 19
- Олеиновая кислота 15
- Олигомеризация (белков в мембране) 48
- Онкогены 199
- Опсин 157
- Орнитинолипиды 9
- Осмотическая работа клетки 120
- Осмотический шок 64
- Пальмитиновая кислота 15, 18
- Перекисное окисление липидов 34
- Переплазматическое пространство 59
- Периферические белки 21
- Пероксисомы 5
- Пивоцитоз 68
- Пирен 78
- Плазматическая мембрана 5
 - антигенная детерменанта 60
- Плазмалогены 10
- Политопические белки 22
- Поляризация флуоресценции 41
- Посттрансляционная модификация белков 23
- Простагландины 135, 190
- Протеникиназы 147, 152
- Протеогликаны 26, 57
- Протеолипиды 23, 24
- Протеолипосомы 6, 60
- Протомер 126
- Протонный насос 122, 128
- Протонофоры 84
- Процессинг 27, 30, 178
- Пурпурные бактерии 122
- Путидоредоксин 134
- Разность потенциалов 118
- Радиоинаktivации метод 49
- Редокс-цепи 121
- Рентгеновское рассеивание нейтронов 75
- Ретиналь 124, 155
- Рецепторы 142, 167
- Родопсин 43, 125, 154
- Ротамеры 32
- Саркоплазматический ретикулум 44, 67, 94

- Сенсорный родопсун 125
 Сигнальный пептид 28
 Синапс 165
 Сквален 19, 20
 Сопрягающие ионы 120
 Спектрин 25, 56
 Стеариновая кислота 15, 16
 Стероидные гормоны 135
 Стероиды 6, 9, 17
 Субклеточные фракции 65
 Сукцинат-CoQ-редуктаза 127
 Сульфатиды 9, 19
 Сульфолипиды 9
 Сульфоцереброзиды 9
 Сфингомиелин 6, 9, 18
 Сфингофосфолипиды 6, 74
- Температурная чувствительность мем-
 бранных ферментов 51
 Температурный коэффициент O_{10} 95
 Термодинамическая стабильность
 мембранного бислоя 52
 Термотропные переходы липидов 35
 Тетраэтиламмоний 102
 Тилакоиды 127
 Тирозинкиназа 138
 Транс-*gosh*-изомеризация 32, 33
 Трансдуцин 159, 161
 Транспорт ионов 99
 активный 100
 анипорт 99, 196
 котранспорт 99, 197
 симпорт 99
 транспортирующие белки 176
 унипорт 99
 Транспортные АТФазы 49
 Топодинамическая регуляция 54
 Тромбоксаны 190
 Тубулин 58
 Туникамицин 24, 28
- УДФ-глюкуронилтрансфераза 49
- Фагосомы 5
 Фагоцитоз 168
 Фазовое разделение липидов 35
 Фазовые переходы в мембране 74
 Фактор роста тромбоцитов 198
 Ферменты
 аллостерические 48
 маркерные 67
 ферментные каскады 52
 Фибронектин 57
 Флавиномононуклеотид 127
 Флиппаза 173
 Флуоресцентные зонды 78
 Фобородопсин 126
 Форболовый эфир 153, 198
 Форсколин 147
 Фосфатидная кислота 37, 148, 151
 Фосфатидилинозит 9, 44, 149
 Фосфатидилсерин 9, 37
- Фосфатидилхолин 6, 9, 44, 60
 Фосфатидилэтаноламин 9, 44, 60
 Фосфоидиэстераза 143, 149
 Фосфоинозитидный цикл 198
 Фосфолипазы 198
 A_2 161
 C 149
 Фосфолипиды 6
 диольные 9
 подвижность в бислое 72
 фазовые переходы 34
 Фосфорилирование дыхательное 127
- X 537A 84
 Химическая работа клетки 121
 Хлортетрациклин 82
 Холестерин 9, 45, 135, 170, 172
 влияние на микровязкость мемб-
 ран 51
 обмен 46, 47, 86
 Холерный токсин 146
 Холинорецептор 165
 Хондроитинсульфат 26
- цАМФ 146
 цГМФ 153
 цГМФ-зависимая протеинкиназа 152
 Центрифугирование
 градиентное 66
 изопикническое 66
 Церамид 6, 26
 Цереброзиды 9, 19
 Циклогексимид 24
 11-*Цис*-ретинаяль 155
 Цитоскелет клетки 55
 Цитохалазин В 175
 Цитохром 134
 P -450 133, 134, 189
 P -448 136
 c 128
 Цитохром- b_5 -редуктаза 134
 Цитохромоксидаза 43, 127, 128
- Электронтранспортная цепь 134
 Электрохимического потенциала ге-
 нерация 121
 Эндоплазматический ретикулум 5,
 19, 30
 гладкий 5
 шероховатый 5, 66
 Эндоцитоз 62, 168
 Энергизация мембраны 119
 Энергопреобразующие мембраны 118
 Эпоксидирование 34
 Эритроциты 17
- Ядерная мембрана 5
 Ядерно-магнитный резонанс 71
 ЯМР-спектроскопия 47

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
Предисловие	3
ГЛАВА I. Структура биомембран	5
I.1. Химический состав биомембран	6
I.1.1. Классификация и характеристика мембранных ли- пидов	6
I.1.2. Мембранные белки	21
I.1.3. Углеводные компоненты	26
I.2. Структура биологических мембран	30
I.2.1. Динамическое состояние липидов в бислое	32
I.2.2. Фазовые переходы	34
I.2.3. Модификация бислоя белками	41
I.2.4. Роль холестерина	45
I.2.5. Белок-липидные взаимодействия	47
I.3. Цитоскелет животной клетки	55
I.4. Особенности строения мембран растительных и бактери- альных клеток	58
I.5. Искусственные мембраны и протеолипосомы	60
ГЛАВА II. Современные подходы к исследованию биомембран	64
II.1. Выделение и характеристика мембранных фракций	64
II.2. Распространенные методы исследования мембранных структур	68
II.2.1. Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)	68
II.2.2. Ядерно-магнитный резонанс (ЯМР)	71
II.2.3. Дисперсия оптического вращения и круговой ди- хроизм	73
II.2.4. Дифференциальная сканирующая калориметрия	73
II.2.5. Метод рентгеновского рассеивания нейтронов	75
II.2.6. Флуоресцентная спектроскопия	77
II.3. Мембранотропные соединения	82
II.4. Использование детергентов в мембранологии	87
II.5. Особенности работы с мембранными ферментами	92
ГЛАВА III. Транспорт через биомембраны	99
III.1. Характеристика транспортных процессов	99
III.2. Ионный гомеостаз клетки	104
III.3. Молекулярные основы первично-активного транспорта ионов	110
III.3.1. АТФазы P-типа	110
III.3.2. АТФазы V-типа	114
III.3.3. Свойства АТФаз F-типа	115
ГЛАВА IV. Превращение энергии в биомембранах	118
IV.1. Энергопреобразующие мембраны	118
IV.1.1. Сопрягающие ионы	120
IV.1.2. Генерация электрохимического потенциала	121

IV.2. Бактериородопсин	122
IV.2.1. Липиды мембран пурпурных бляшек	125
IV.2.2. Галородопсин и сенсорный родопсин	125
IV.3. Дыхательная цепь	127
IV.3.1. Н-АТФ-синтетаза	128
ГЛАВА V. Ферментативная система микросомного окисления	133
V.1. Изоформы цитохрома P-450	134
V.1.1. Регуляция активности монооксигеназ	137
V.2. Микросомное окисление чужеродных соединений	139
ГЛАВА VI. Мембранные рецепторы	142
VI.1. Передача информации в мембранах	142
VI.1.1. G-белки и вторичные мессенджеры	144
VI.1.2. Роль мембранных фосфоинозитидов в передаче сигнала	149
VI.1.3. Метаболизм фосфоинозитидов и регуляция проницаемости мембран для ионов Ca^{2+}	151
VI.1.4. цГМФ — вторичный мессенджер	153
VI.2. Передача сигнала в фоторецепторных клетках сетчатки	154
VI.2.1. Трансдуцин и G-белки — родственные ферменты	162
VI.3. Рецепторы возбудимых тканей	164
VI.4. Рецепторы, отвечающие за перенос макромолекул через мембрану в клетку	168
VI.4.1. Рецепторы липопротеинов низкой плотности	169
ГЛАВА VII. Биогенез клеточных мембран	172
VII.1. Биогенез мембран и метаболизм мембранных липидов	172
VII.2. Внутриклеточный транспорт липидов	174
VII.2.1. Внутриклеточный транспорт холестерина	174
VII.2.2. Внутриклеточный транспорт фосфолипидов	175
VII.3. Биогенез биологических мембран и внутриклеточный транспорт мембранных белков	177
VII.3.1. Пути гликозилирования белков в аппарате Гольджи	179
ГЛАВА VIII. Патология биомембран	185
VIII.1. Перекисное окисление липидов	185
VIII.1.1. Неферментативное перекисное окисление липидов	187
VIII.1.2. Ферментативное перекисное окисление липидов	189
VIII.1.3. Механизмы повреждения мембранных структур при перекисном окислении липидов	193
VIII.2. Патологии биологических мембран, связанные с гипертонической болезнью	195
VIII.3. Патологии биомембран, связанные с нарушением механизмов трансмембранной передачи информации	198
Литература	201
Предметный указатель	203

Учебное издание

ВВЕДЕНИЕ В БИОМЕМБРАНОЛОГИЮ

Зав. редакцией *Н. М. Глазкова*

Редактор *Э. И. Кранс*

Художественный редактор *Ю. М. Добрянская*

Художник *Б. С. Вехтер*

Технический редактор *О. В. Андреева*

Корректоры *И. А. Мушникова, Т. С. Милякова*

ИБ № 3737

Сдано в набор 05.12.89 Подписано в печать 13.06.90
Л-11060 Формат 60×90/16 Бумага кн.-журн.
Гарнитура литературная Печать высокая
Усл. печ. л. 13,0 Уч.-изд. л. 14,64
Тираж 5475 экз. Заказ 212. Изд. № 890
Цена 90 коп.

Ордена «Знак Почета» издательство Московского университета.
103009, Москва, ул. Герцена, 5/7.

Типография ордена «Знак Почета» изд-ва МГУ.
119899, Москва, Ленинские горы.